



***“APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA MICROARRAY AL MANEJO
DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA”***

Tesis Doctoral

*Universidad de Alcalá de Henares
Departamento de Medicina*

Inmaculada Cerecedo Carballo

Alcalá de Henares, Mayo 2009

D. Javier Zamora Romero, Doctor en Biología y Bioestadística de la Unidad de Bioestadística Clínica del Hospital Ramón y Cajal.

CERTIFICA: Que Dña. Inmaculada Cerecedo Carballo, Licenciada en Medicina ha realizado, bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado ***“APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA MICROARRAY AL MANEJO DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA”***, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne a mi juicio las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarios para ser sometido a lectura y discusión ante el tribunal correspondiente.

Para que conste y a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 29 de Abril de 2009.

Dr. Javier Zamora Romero

Dña. Belén de la Hoz Caballer, Doctora en Medicina y Cirugía y Facultativo especialista de Área del Servicio de Alergia del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

CERTIFICA: Que Dña- Inmaculada Cerecedo Carballo, Licenciada en Medicina ha realizado, bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado ***“APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA MICROARRAY AL MANEJO DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA”***, para optar al grado de Doctor en Medicina.
Dicho trabajo reúne a mi juicio las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarios para ser sometido a lectura y discusión ante el tribunal correspondiente.

Para que conste y a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 29 de Abril de 2009.

Dra. Belén de la Hoz Caballer

A mis padres y a mi hermano

Escribir los agradecimientos de esta tesis doctoral significa haber concluido un intenso trabajo, realizado en colaboración con muchas personas que me han apoyado a lo largo de estos cuatro años de investigación y análisis. Trabajar junto a ellos ha sido para mí un gran honor, por ello quisiera comenzar esta tesis agradeciendo su dedicación y ayuda a todas las personas que de manera directa o indirecta han hecho posible su realización.

En primer lugar quiero agradecer su labor y dedicación a mis dos directores de Tesis Doctoral. **La Dra. Belén de la Hoz**, a la cual quiero agradecerle haberme dado esta oportunidad y la idea original para esta Tesis. Para mí es un motivo de orgullo que una gran profesional como ella depositase su confianza en mí al proponerme la realización de este proyecto. **El Dr. Javier Zamora** al cual quiero agradecer su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación, sin las cuales el desarrollo de esta tesis no hubiese sido posible.

En segundo lugar quiero agradecer al Dr. **Hugh Sampson** por haber depositado su confianza en mí y haber permitido incorporarme durante un año al grupo de investigación que dirige en el Jaffe Food Allergy Institute de "Mount Sinai School Of Medicine". Al Dr. **Wayne Shreffler** por su desinteresada colaboración y asistencia profesional al poner a mi disposición todo su conocimiento. Al resto de miembros del laboratorio. Mi más sincero agradecimiento a la Dra. **Ana Belén Blázquez**, por su apoyo y su amistad durante los meses que trabajé en Nueva York.

Un agradecimiento muy especial a **Alfonso Muriel** y al Dr. **Víctor Abaira**, por su inestimable ayuda e incondicional apoyo.

A Dra. **Mª Carmen Dieguez**, por ser un referente a lo largo de estos años y por su confianza en esta nueva etapa de nuestra carrera profesional.

No puedo dejar de agradecer a la **Fundación LAIR** y a la **Fundación SEAIC** por haber financiado este proyecto. Gracias a estas fundaciones he tenido la oportunidad de haber empezado a desarrollar mi labor de investigadora.

A los **padres** y los **niños** que han participado en el estudio, por su tiempo y confianza.

A todos mis amigos por estar ahí siempre y darme su apoyo.

A mi familia por su continuo por su paciencia y comprensión cuando este trabajo me ha absorbido por completo.

CAPITULO 1: MOTIVACIÓN Y MARCO CONCEPTUAL	9
1.1 MARCO CONCEPTUAL Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
1.2 ENUNCIADO DE LA TESIS	13
1.3 PLANTAMIENTO EXPERIMENTAL	13
1.4 ESQUEMA DE LA ESPOSICIÓN	15
CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN	17
2.1 ALIMENTACIÓN DEL NIÑO SANO. LA LECHE: VALOR NUTRICIONAL Y CONSUMO	19
2.1.1 La alimentación del niño sano	19
2.1.2 La leche: valor nutricional y consumo	23
2.2 ALERGIA A ALIMENTOS. ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA	30
2.2.1 Inmunidad intestinal y mecanismos de tolerancia inmunológica	30
2.2.2 Definición de alergia a alimentos	35
2.2.3 Alimentos implicados en alergia alimentaria	36
2.2.4 Epidemiología	37
2.2.5 Alergenos implicados. Alergenos de la leche	39
2.2.6 Manifestaciones clínicas de la alergia a alimentos. Manifestaciones de la APLV	41
2.2.7 Diagnóstico de la alergia a alimentos. Diagnóstico de la APLV. Aplicación de los microarrays en el diagnóstico de la alergia a alimentos.	45
2.2.7.1 Diagnóstico de la alergia a alimentos	48
2.2.7.2 Diagnóstico de la APLV	55
2.2.7.3 Aplicación de la tecnología microarray al diagnóstico de APLV.	59
2.2.8 Tratamiento de la alergia a alimentos	63
2.2.9 Pronóstico e historia natural de la APLV	65
CAPITULO 3: OBJETIVOS	67
CAPÍTULO 4: MATERIAL Y MÉTODOS	71
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	73

4.3.1 Historia clínica	75
4.3.2 Pruebas cutáneas	76
4.3.3 Determinación de IgE	77
4.3.4 Provocación oral controlada	77
4.3.5 Determinación de epítomos lineales mediante microarray de péptidos	81
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87
4.4.1 Estadística descriptiva	87
4.4.2 Estadística analítica	87
4.4.2.1 Evaluación de pruebas diagnósticas	87
4.4.2.2 Determinación de epítomos lineales mediante microarray	90
CAPÍTULO 5: RESULTADOS	93
5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES	95
5.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	96
5.3 RESULTADOS DE LAS PROVOCACIONES ORALES	97
5.3 DIFERENCIAS ENTRE PACIENTES TOLERANTES Y REACTIVOS	98
5.4 VALIDEZ DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	99
5.5 ENSAYO MICROARRAY DE PÉPTIDOS	102
CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN	119
6.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DISPONIBLES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA HABITUAL	121
6.2 APLICACIÓN DE LOS MICROARRAYS DE PÉPTIDOS AL MANEJO DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA	128
6.3 PLANES FUTUROS	135
CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES	137
CAPÍTULO 8: SUMMARY	141
CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA	147
CAPÍTULO 10: ANEXOS	175

APLV	Alergia a proteínas de leche de vaca
IgA, IgE, IgG, IgM	Inmunoglobulinas A, E, G y M
IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12	Interleuquinas 2, 4, 5, 10 y 12.
ALA	Alfalcatoalbúmina
BLG	Betalactoglobulina
CAS	Caseína
DA	Dermatitis atópica
CD	Celulas dendríticas
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
DNA	Ácido desoxirribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
CP+	Cociente de probabilidad positivo
CP-	Cociente de probabilidad negativo
CPA	Células presentadoras de antígenos
CV	Coeficiente de variación
EAACI	Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (European Academy of Allergy and Clinical Immunology).
Esp	Especificidad
FEIA	Fluoroenzaimunanoálisis
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
HAS	Albumina sérica humana
IC 95%	Intervalo de confianza al 95%.
MAPA	Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación
PC	Pruebas cutáneas
PODCCP	Provocación oral doble ciego controlada con placebo
PO	Provocación oral
PP	Placas de Peyer

PPB	Protein printing buffer.
PBS-T	Phosphate-buffered 0.5% tween 20.
SEAIC	Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica.
Sen	Sensibilidad
SNR	Señal-ruido ratio
Th 1, Th 2 y Th 3:	Linfocitos T colaboradores (helper) 1, 2 y 3.
TGF-β	Transforming Growth Factor tipo beta
VN	Verdadero negativo.
VP	Verdadero positivo.
VPN	Valor predictivo negativo.
VPP	Valor predictivo positivo.



Capítulo 1

MOTIVACIÓN Y

MARCO CONCEPTUAL

1.1 MARCO CONCEPTUAL Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La alergia a alimentos se ha convertido en un problema de salud de primer orden en los países industrializados en las dos últimas décadas. Los estudios de prevalencia llevados a cabo en adultos y niños de diferentes países, concluyen que los alimentos más frecuentemente implicados en reacciones alérgicas son el huevo, la leche, el cacahuete, los frutos secos, el pescado, marisco, la soja, el trigo, las frutas y las legumbres. La importancia relativa de los alimentos responsables varía notablemente con la edad de los pacientes y la localización geográfica. En niños el huevo y la leche de vaca son los alimentos más frecuentemente implicados en todos los estudios. Esto concuerda con el hecho de que son los alimentos más consumidos en occidente en este grupo de edad. En España se confirma estos hallazgos y en menores de 5 años los alimentos encontrados con mayor frecuencia son la leche de vaca y el huevo de gallina¹. Según diferentes autores, en el primer año de vida la alergia confirmada a la leche de vaca oscila entre 0,36 y el 1,9%, y ocupa el tercer lugar después del huevo y el pescado, como motivo de consulta por la alergia a alimentos. Por lo tanto la alergia a la leche es una patología cuya prevalencia se está viendo incrementada de forma progresiva en los últimos años y es causa de reacciones potencialmente graves.

La aparición de los síntomas suele coincidir con la introducción de la lactancia artificial, tras un periodo de lactancia materna en los primeros meses de vida. Los síntomas pueden aparecer incluso con la primera toma. Si el niño tolera bien los primeros biberones, el intervalo entre el comienzo de la alimentación artificial y la aparición de síntomas, no suele superar la primera semana. Las manifestaciones clínicas más características incluyen afectación cutánea (desde urticaria perioral hasta urticarias generalizadas con o sin angioedema), respiratoria (rinitis, broncoespasmo), digestiva (dolor abdominal, vómitos, diarrea), y reacciones generalizadas o anafilaxias con afectación de varios órganos, y que pueden llegar a ser de compromiso vital si cursan con broncoespasmo severo, edema laríngeo o hipotensión (shock anafiláctico). La alergia alimentaria es la principal causa de reacciones anafilácticas tratadas en los servicios de urgencias hospitalarias^{2,3}.

No existe actualmente un tratamiento activo de la alergia a la leche (ni a ningún otro alimento). Los pacientes alérgicos deben evitar de forma estricta la leche y todos los productos lácteos derivados. Como alternativas, en la primera infancia pueden utilizar fórmulas extensamente hidrolizadas de caseína y/o proteínas séricas, y a partir de los 2 años fórmulas de soja. Estas fórmulas alternativas son aceptables en el primer año de vida, y mientras el niño permanezca en un entorno familiar seguro. Una vez que el niño alérgico a la leche de vaca comienza a acudir a la guardería, o es escolarizado, comienza a tener más riesgo de exponerse a la leche, y tanto sus familiares como cuidadores/educadores deben ser informados de su alergia para evitar trasgresiones dietéticas accidentales que pueden inducir reacciones alérgicas, de variable e impredecible intensidad, pero potencialmente graves. Con la diversificación de la

dieta y la socialización, el riesgo de reacciones accidentales aumenta, y se debe vigilar la composición de todos los alimentos, lo que es una fuente de estrés y altera notablemente la calidad de vida del paciente y de todo su entorno familiar. Ante la eventualidad de reacciones alérgicas los pacientes deben ser instruidos en el reconocimiento y tratamiento precoz de las mismas y deben de disponer de un plan escrito de acción en el que se les indique la medicación a utilizar, que debe incluir adrenalina autoinyectable en aquellos pacientes con riesgo de sufrir una anafilaxia. Estas indicaciones deben ser seguidas hasta que el paciente desarrolle tolerancia, y son de por vida para aquellos individuos con alergias persistentes.

Afortunadamente, en muchos de los casos, la alergia a la leche de vaca es una patología dinámica, que puede evolucionar hacia la tolerancia. Los pacientes, una vez diagnosticados y tras un periodo de evitación, y son revisados de forma regular en la consulta en espera de que alcancen dicho momento de tolerancia. En la búsqueda de dicho paso de la alergia a la tolerancia disponemos de una serie de pruebas, como las pruebas cutáneas y la determinación de anticuerpos IgE específicos, que orientan acerca del momento evolutivo de la enfermedad en el que se encuentra el paciente. Estas pruebas han demostrado limitaciones a la hora de predecir el momento de tolerancia, limitaciones en muchas ocasiones ligadas a la calidad de los extractos que se utilizan para su realización. Este hecho hace que sea precisa la realización de una provocación oral con el alimento para confirmar la reactividad clínica del paciente con la ingesta del mismo, es decir, si continúa siendo alérgico o ha alcanzado la tolerancia. La provocación oral constituye la prueba de oro de la alergia a alimentos, sin embargo consume muchos recursos y no está exenta de riesgos para el paciente. Aunque el objetivo de la provocación es inducir la menor reacción posible en el paciente que confirme el diagnóstico de forma controlada, en ocasiones pueden producirse reacciones graves. Esta posibilidad hace que las condiciones necesarias para realizar una provocación oral de forma segura para el paciente incluyan personal entrenado y todo el equipo necesario para el tratamiento de una reacción, incluido reanimación cardiopulmonar avanzada.

En la práctica clínica habitual, los alergólogos se encuentran en muchas ocasiones con provocaciones orales positivas en pacientes que 'a priori' se esperaba que hubiesen alcanzado ya la tolerancia al alimento. Estos pacientes no tienen ninguna característica clínica distinta, ni tampoco analítica que nos permita diferenciarlos de los niños que tienen una provocación negativa, es decir que ya han superado su alergia a las proteínas de leche de vaca. La ausencia de reacciones ante ingestas accidentales del alimento, así como las pruebas cutáneas y niveles de IgE específica ayudan a tomar la decisión de indicar una provocación con leche, por ejemplo, en nuestro medio, estudios previos han establecido como punto de corte para indicar una provocación con leche, un valor de IgE específica por debajo de 2.5 KU/l, sin embargo, la realidad clínica es que algunos niños presentan reacciones en la provocación con niveles de IgE muy bajos, próximos al nivel de detección de la técnica (0.35 KU/l), siendo éstas potencialmente graves, precisando tratamiento agresivo y periodos de observación largos

(en ocasiones en unidades de cuidados intensivos). La actitud con estos niños es continuar con una dieta estricta de evitación hasta la siguiente revisión. ¿Qué hacer con estos pacientes cuando acuden a revisión? Es difícil es tomar la decisión de provocar a un paciente que previamente ha tenido ya una reacción sin disponer de pruebas que indiquen si su situación ha evolucionado. Estos niños siguen habitualmente, manteniendo niveles de IgE bajos (igual que antes de la primera provocación). Esta situación hace necesaria la búsqueda de nuevas técnicas de diagnóstico que nos ayuden a predecir mejor el momento de la tolerancia a la leche vaca.

La presente tesis propone la aplicación de la tecnología microarray de péptidos en la búsqueda de nuevas técnicas diagnósticas en la alergia a proteínas de leche de vaca.

1.2 ENUNCIADO DE LA TESIS

La presente memoria enuncia la siguiente tesis *“La descripción de epítomos lineales mediante microarrays de péptidos pueden ser útiles en predecir si se ha alcanzado la tolerancia clínica en los pacientes alérgicos a la proteínas de leche de vaca”*.

1.3 PLANTAMIENTO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de los experimentos presentados en esta memoria se seleccionaron pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca en seguimiento en la consulta de Alergia Infantil que acudieron a revisión entre enero de 2004 hasta febrero de 2006. Siguiendo la práctica clínica habitual se realizó una anamnesis y se solicitaron pruebas cutáneas y niveles de IgE específica para leche y proteínas alergénicas de la leche (alfalactoalbúmina, betalactoglobulina y caseína) en suero. Se reservó una alícuota de suero para los ensayos de microarrays. Se indicó una provocación oral con leche en aquellos pacientes que tenían niveles de IgE frente a leche por debajo de 2.5 KU/l. En función del resultado de la provocación los pacientes fueron divididos en dos grupos: tolerantes y reactivos.

En el laboratorio de microarrays del Jaffe Food Allergy Institute (The Mount Sinai School of Medicine, Nueva York) se imprimieron ‘chips’ con una librería de péptidos sintetizados comercialmente y cubriendo la secuencia lineal de los alérgenos de la leche. El inmunoensayo se realizó incubando con el suero de los pacientes y detectando posteriormente IgE e IgG4 con anticuerpos marcados con fluoróforos. La señal de fluorescencia se leyó y digitalizó mediante un escáner, exportando los datos que fueron finalmente depurados, normalizados y analizados.

La elección de la tecnología microarray para desarrollar los objetivos planteados viene motivada por su exitosa aplicación previa. Inicialmente en el campo de la expresión génica y

posteriormente en el estudio de las respuesta inmunológicas en diferentes enfermedades, incluida la alergia a alimentos en la infancia.

Los microarrays aportan grandes ventajas que los hacen muy atractivos en el estudio de la inflamación alérgica al permitir estudiar cientos de dianas en paralelo con mínimas cantidades de suero. Mediante los abordajes clásicos se puede estudiar un número limitado de alérgenos en cada ensayo, lo que supone repetir muchos experimentos con el consumo de tiempo y recursos que conlleva. Por el contrario, con los ensayos microarray se miniaturizan los experimentos permitiendo estudiar en el mismo ensayo cientos o miles de moléculas con una cantidad mínima de muestra (en este caso suero de pacientes en edad pediátrica).

Los prometedores los resultados previos en el estudio de alergia a cacahuete y las inmensas posibilidades de aplicación en la práctica clínica han conducido a abrir una nueva línea en el estudio de la alergia a las proteínas de leche de vaca. Parte de los resultados obtenidos se han publicado en 'Journal of Allergy and Clinical Immunology'. **(Anexo 1)**.

1.4 ESQUEMA DE LA ESPOSICIÓN

La siguiente memoria está estructurada en los siguientes capítulos:

- Capítulo 1** Presenta las motivaciones y el marco conceptual de la tesis así como su enunciado y las principales aportaciones.
- Capítulo 2** Introducción: Presenta la importancia de la leche, su valor nutricional y consumo. Revisa la alergia a los alimentos en la infancia con especial dedicación a la alergia a las proteínas de leche de vaca en los aspectos relacionados con el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Dado que la presente tesis doctoral se centra en el diagnóstico, en concreto en la aplicación de una nueva tecnología se alterará el orden natural de la exposición. De esta manera, se comenzará revisando la inmunidad intestinal, alérgenos implicados, el tratamiento y el pronóstico para finalizar con el diagnóstico de la alergia a los alimentos. Discute las aportaciones de los microarrays en el estudio de la respuesta alérgica.
- Capítulo 3** Expone los objetivos.
- Capítulo 4** Material y métodos: Describe los criterios de inclusión y exclusión de la población de estudio, pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca. Muestra el planteamiento y las condiciones de los experimentos de laboratorio. La librería de péptidos empleada, la secuencia del inmunoensayo, la lectura de los resultados y la fase de normalización y análisis de los datos obtenidos.
- Capítulo 5** Resultados: Expone las características de los pacientes incluidos, tanto clínicas como analíticas, así como el análisis de los resultados de los ensayos microarray de péptidos en los pacientes incluidos.
- Capítulo 6** Discute los resultados encontrados en el ensayo, la relación con lo descrito previamente y su aportación en el diagnóstico de la alergia a proteínas de leche de vaca.
- Capítulo 7** Presenta las conclusiones fundamentales de la tesis.
- Capítulo 8** Se resume en lengua inglesa la memoria presentada.
- Capítulo 9** Bibliografía.
- Capítulo 10** Anexos.



Capítulo 2

INTRODUCCIÓN

2.1 ALIMENTACIÓN DEL NIÑO SANO. LA LECHE: VALOR NUTRICIONAL Y CONSUMO.

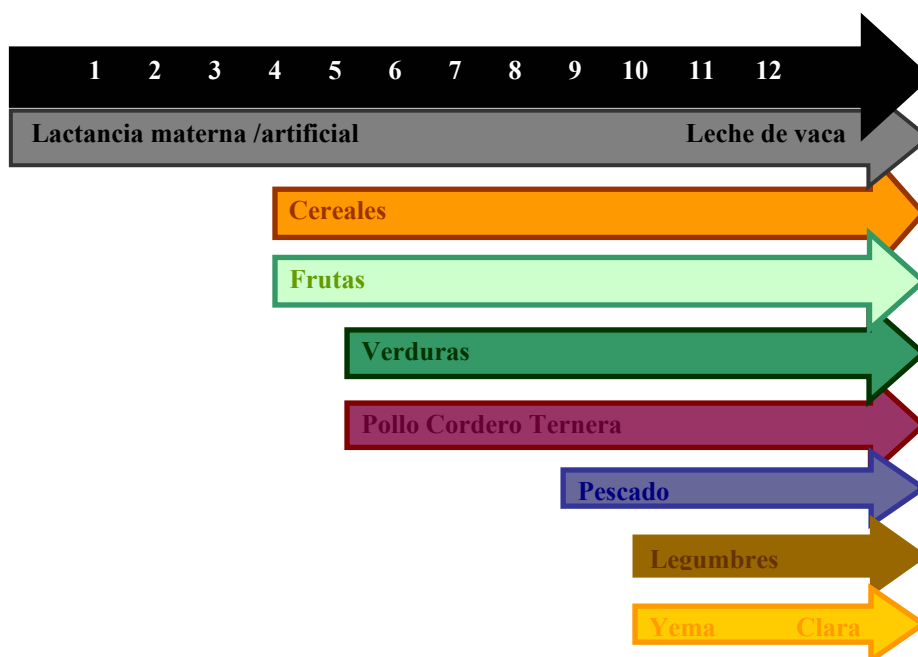
2.1.1 La alimentación del niño sano.

Periodos de alimentación del niño.

Los "periodos de la alimentación del niño", como definió el Comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría son tres^{4,5}: periodo de lactancia (el alimento debe ser de forma exclusiva la leche materna o las fórmulas para lactantes, 4-6 primeros meses de vida), periodo de transición (se inicia la diversificación de los alimentos, 6-12 meses), y el periodo de adulto modificado (adaptación progresiva hacia la alimentación del adulto, edad preescolar y escolar).

La lactancia materna o las fórmulas de inicio cubren todas las necesidades del lactante sano, como alimento exclusivo, hasta los 4-6 meses de vida. A partir de esa edad se debe llevar a cabo la diversificación alimentaria. Se entiende por diversificación de los alimentos o alimentación complementaria, a la variación o introducción en la dieta del lactante de alimentos diferentes a la leche materna o de fórmula. Se trata de conducir al niño de manera gradual a la dieta del adulto. Las razones para la diversificación son en primer lugar nutricionales, pero también adaptativas al desarrollo neuromuscular, así como razones de tipo familiar, social o educacional, ya que errores en la introducción de alimentos pueden dar lugar a enfermedades como la anorexia infantil, la obesidad o la hipertensión.

El primer alimento que puede complementar la lactancia son los *cereales* (4º mes) (Figura 1). Las primeras harinas deben ser predigeridas, sin azúcar y sin gluten (harinas de arroz, maíz o tapioca); este último se introducirá a los 6 meses de vida (trigo, avena, cebada y centeno). Las *frutas* constituyen un aporte energético fundamental. Es aconsejable utilizar fruta fresca, e ir introduciéndolas una a una a partir de los 4-6 meses. Las *verduras* se ofrecerán a partir de los 6 meses en forma de puré, evitando los primeros meses las espinacas, col y remolacha, que pueden ser causa de metahemoglobinemia por su contenido en nitratos; estas últimas pueden ser introducidas a partir de los 12 meses. La *carne* aporta fundamentalmente proteínas, siendo además fuente de hierro y vitamina B. Suele ofrecerse en primer lugar el pollo (6º mes) por ser más digerible, de forma cocida y triturado con la verdura. Posteriormente se introduce el cordero (7º mes), y después la ternera (8º mes). El *pescado* no se introducirá antes de los 9-10 meses. Las *legumbres* pueden ofrecerse en el último trimestre, hacia el año. El *huevo* no debe introducirse hasta los 10 meses, comenzando por yema cocida que puede añadirse a la papilla o puré de la cena. La clara cocida se dará a partir del año.

Figura 1. Diversificación alimentaria.

Muchos alimentos pueden actuar como antígeno en los humanos. Con la diversificación de la alimentación y la introducción de nuevas proteínas en la dieta la sensibilización a múltiples alimentos como pescado, legumbres, soja, cacahuete, trigo, apio entre otros, cada vez son más frecuentes. Si bien, las proteínas sensibilizadoras más comunes en la infancia son la caseína, la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina de la leche de vaca, que es el primero de los antígenos alimentarios introducido en la mayoría de los lactantes, y la ovoalbúmina y ovomucoide del huevo.

Requerimientos nutricionales del niño.

Los requerimientos nutricionales del niño se van modificando en función de la edad (Tabla 1). Las necesidades energéticas del lactante durante el primer año son muy grandes, inversamente proporcionales a la edad del niño, y varían con la velocidad de crecimiento. Entre los 12 meses y los 3 años, se produce un cambio negativo en el apetito y en el interés por los alimentos. Entre los 4 y los 6 años, persisten el poco interés por los alimentos y las bajas ingestas. Este es el momento de la consolidación de los hábitos nutricionales, mediante el aprendizaje por imitación y la copia de las costumbres alimentarias en su familia. De los 7 a los 12 años, se produce un aumento progresivo de la actividad intelectual y un mayor gasto calórico por la práctica deportiva, y de forma paralela tiene lugar un aumento de la ingesta⁶.

Tabla 1. Requerimientos nutricionales del niño.

Lactancia	1-6 meses	108 kcal/kg/día	-	-	Altas necesidades energéticas
	7-12 meses	96 kcal/kg/día			
Preescolar	1-2 años	102 kcal/kg/día	2 a 2,5 kg/año	12 cm/año	Escaso apetito, desinterés por los alimentos
	2-3 años		2 a 2,5 kg/año	8-9 cm/año	
	4-6 años	90 kcal/kg/día	2,5 a 3,5 kg/año	5-7 cm/año	Consolidación hábitos nutricionales
Escolar	7-9 años	70 kcal/kg/día	2 kg/año	5-6 cm/año	Aumento de la ingesta, mayor gasto calórico
	10-12 años		4-4,5 kg/año		

Datos tomados de National Research Council. Committee Food and Nutrition Board. Recommended Dietary Allowances (15).

Recomendaciones dietéticas

Un menú variado cubre todas sus necesidades nutricionales. Deben evitarse las ingestas entre horas. En los niños escolarizados, los menús escolares deben aportar el 30-35% de los requerimientos energéticos y al menos el 50% de las proteínas diarias.

Se debe incluir a diario alimentos de todos los grupos (Tabla 2).

Tabla 2. Grupos de alimentos. Sociedad española de dietética y ciencias de la alimentación.

Grupos de alimentos		Composición predominante	Alimentos
I	Energético	Hidratos de carbono	Cereales, patatas, azúcar
II	Energético	Lípidos	Mantequilla. aceites. grasas
III	Plásticos	Proteínas	Derivados lácteos
IV	Plásticos	Proteínas	Carnes, huevos, pescados, legumbres, frutos secos
V	Reguladores	-	Hortalizas, verduras
VI	Reguladores	-	Frutas

Tomado de <http://www.nutricion.org>.

La ingesta de leche y derivados debe mantenerse entre 500-1000 ml / día, ya que es la principal fuente de calcio de la dieta. Los cereales son la base de la pirámide de los grupos de alimentos en una dieta equilibrada y son altamente recomendables en la alimentación diaria de los niños. Otros alimentos de ingesta diaria deben ser las frutas y verduras frescas. El niño debe comer un mínimo de 2 o 3 piezas de frutas maduras cada día. Se debe promover la ingesta de legumbres. Son preferibles las carnes y pescados magros, siendo más recomendable el consumo de pescado frente a la carne por su menor contenido energético y su mejor perfil graso. Se debe limitar el consumo de embutidos (ricos en grasa saturada, colesterol y sal). Las recomendaciones actuales en cuanto al consumo de huevos por los niños son las de una ingesta de 3-4 huevos a la semana, teniendo en cuenta que este alimento está presente también en salas, postres y demás platos preparados⁷.

Figura 2. Pirámide de la alimentación saludable.



2.1.2 La leche: valor nutricional y consumo

Valor nutricional

La leche es la única alimentación de los mamíferos recién nacidos. La composición de la secreción láctea es específica de la especie y se adapta a las necesidades de crecimiento de sus crías, siendo su composición variable en función del tiempo.

En la especie humana, donde prima la maduración del sistema nervioso sobre el aumento de masa corporal, la secreción láctea de la mujer es menos calórica y menos proteica que en otros mamíferos. La leche en los primeros días (calostro) es una secreción rica en sustancias proteicas e inmunológicamente activas. En semanas posteriores va disminuyendo la cantidad de inmunoglobulinas y aumentando la proporción de lactosa y lípidos. Comparando la leche humana madura con la de otros mamíferos, destaca un contenido proteico bajo (0,9-1,1 g/dL frente a 3,5 g/dL en la leche de vaca). Las proteínas con función plástica representan una cantidad menor de 0,9 g/dL, teniendo las restantes (IgA, transferina, lisozima) funciones distintas de las nutricionales^{8,9}.

La leche de mujer es el alimento específico y por tanto, el más adecuado para el niño durante el primer semestre de vida. En ocasiones, la lactancia materna no puede establecerse o mantenerse y se sustituye total o parcialmente por leche de otros mamíferos y, en nuestro medio, el más utilizado es la vaca. La leche de vaca es cuantitativamente y cualitativamente diferente (Tabla 3). Su composición proteica consiste en un 80% de caseína y un 20% de proteínas séricas, frente a un 40% de caseína y 60% de proteínas séricas en la leche de mujer. Además la leche de vaca contiene betalactoglobulina (BLG), que está ausente en la leche de mujer.

Tabla 3.

COMPOSICIÓN MEDIA DE LA LECHE HUMANA Y DE VACA		
	MUJER	VACA
Energía (Kcal/100ml)	70	68
Proteínas (g/100ml)	1,1	3,5
Caseínas	40%	80%
Proteínas del suero	60%	20%
Lactoalbúmina	0,16	0,09
Lactoferrina	0,17	0,001
Lisozima	0,04	-
Seroalbúmina	0,04	0,03
IgA secretora	0,14	-
Grasas (g/100ml)	4,5	3,7
Linoleico	7-12%	2%
Colesterol	0,22	0,12
Glúcidos (g/100 ml)	7,2	6
Lactosa	6,2	5
Macrominerales (mEq/100ml)		
Sodio	0,7	2,2
Potasio	1,3	3,5
Calcio	1,4	2,9
Microminerales (µg/100ml)		
Zinc	300	3500
Cobre	37	20
Hierro	60	50
Yodo	8	4,5
Manganeso	1	3
Selenio	2,5	3
Cromo	4	2
Vitaminas (por 100ml)		
A (UI)	200	100
D (UI)	2,2	1,4
C (µg)	4300	4000
E (µg)	180	40
K (µg)	1500	6000
B1 (µg)	16	44
B2 (µg)	36	44
B6 (µg)	10	175
B12 (µg)	0,03	0,4
Niacina (µg)	147	94
Biotina (µg)	0,6	3,5
Ac. fólico	5,2	5,5

Importancia económica de la producción láctea

El consumo regular de leche animal como alimento se remonta al neolítico, momento en que el hombre deja de ser nómada y comienza a cultivar la tierra para alimentar a los animales capturados que mantenía junto al hogar. En las proximidades de Ur, antigua Caldea, región situada en la baja Mesopotamia, se han encontrado bajorrelieves sumerios que muestran el ordeño de vacas realizados entre 4000-3100 a.C. En la Edad Media, el consumo de la leche se concentraba en el mundo rural, principalmente sirvientes y artesanos. Posteriormente, en el

renacimiento se generaliza el consumo de derivados lácteos. Es en el siglo XIX, con la revolución industrial y gracias al desarrollo tecnológico, cuando la leche deja de ser un alimento del medio rural y empieza a ser consumida también en el medio urbano. Nicolás Appert realiza los primeros intentos de conservación de la leche mediante la esterilización. William Newton consiguió conservar la leche calentándola a una temperatura menos elevada y agregándole azúcar (leche condensada). En 1864 Louis Pasteur consigue con el tratamiento térmico de la leche cruda (pasterización) conseguir mejorar la conservación del alimento. En el siglo XX la mejora de las técnicas de conservación ha permitido que la leche y los derivados lácteos se conviertan en la materia prima de una importante industria.

La industria alimentaria utiliza diferentes métodos para conservar la leche durante períodos prolongados, procurando no afectar con ello el valor nutritivo, color, gusto y olor de la leche. Las siguientes técnicas son las más utilizadas:

- Leche Higienizada: La ebullición (temperatura superior a los 100°C) es un proceso obligatorio en la leche fresca (la obtenida tras el ordeño de la vaca), que modifica su olor y sabor a cambio de obtener una garantía higiénica
- Leche Uperizada (UHT): Procedimiento similar a la esterilización (con calentamiento a 130-140°C durante 1-2 sg), pero con las ventajas sobre ella de conservar el sabor y el color de la leche. Su valor nutritivo es similar al de la leche pasteurizada, aunque la conservación es más larga en envases protegidos del oxígeno y de la luz, se debe de mantener en frío
- Leche Esterilizada: Si la aplicación de calor supera la temperatura de ebullición, se obtiene la leche esterilizada. Normalmente se consigue con temperaturas del orden de 110-115°C durante 20-30 minutos, destruye todos los microorganismos y esporas. Se conserva como la UHT unos 6 meses, pero las pérdidas vitamínicas son mayores, afectando en pequeña medida el color y sabor de la leche.
- Leche en Polvo o Deshidratada: Es el alimento obtenido tras la evaporación casi completa del agua que contiene la leche, son fáciles de conservar y almacenar en recipientes cerrados y lugares secos. Se puede obtener a partir de la leche entera, semidesnatada y desnatada.
- Leche Evaporada o Concentrada: Es una leche esterilizada cuyo volumen se ha reducido a la mitad por ebullición continuada. Debe ingerirse, previa reconstitución con igual volumen de agua.
- Leche Condensada (azucarada): Es la leche evaporada a la que se ha añadido un peso igual de azúcar. El 50% de su peso es, pues, sacarosa, por lo que

proporcionalmente contiene menos proteínas y grasa que las otras variedades lácteas y por el contrario mas hidratos de carbono.

- Leche Desnatada: Es una leche esterilizada a la que se le ha extraído la casi totalidad de sus lípidos, pero conserva sus proteínas, lactosa y calcio fundamentalmente, aunque no sus vitaminas liposolubles. En la variedad semidesnatada, la eliminación de grasa es la mitad.
- Leche fermentada o acidificada: Leche cuya lactosa ha sido digerida por microorganismos que producen ácido láctico (*Lactobacillus acidifillus*) y que las hacen mas espesas (yogurt). Si a las leches acidificadas se les adicionan levaduras las transformaran en dos bebidas de baja concentración alcohólica; Kumis y Kéfir.

La producción mundial de leche en 2007 alcanzó los 657 millones de toneladas, un 2,2 por ciento más que en 2006; y los análisis preliminares de 2008 apuntan a una continuación de este crecimiento. Con un aumento de más del 4 por ciento, los países en desarrollo, presididos por China, la India, el Pakistán y los países de América del Sur, representan una gran parte de las variaciones registradas en la producción mundial.

Las industrias lácteas en España procesan una media anual estimada de 7 millones y medio de toneladas de leche de vaca, oveja y cabra (Tabla 4). Sus ventas representan en torno al 10% del valor de las ventas de la Industria Alimentaria, lo que significa un 2% del total de la Industria española.

En su actividad se emplean de forma directa más de de 32.000 personas constituyendo un sector de gran importancia para la economía española.

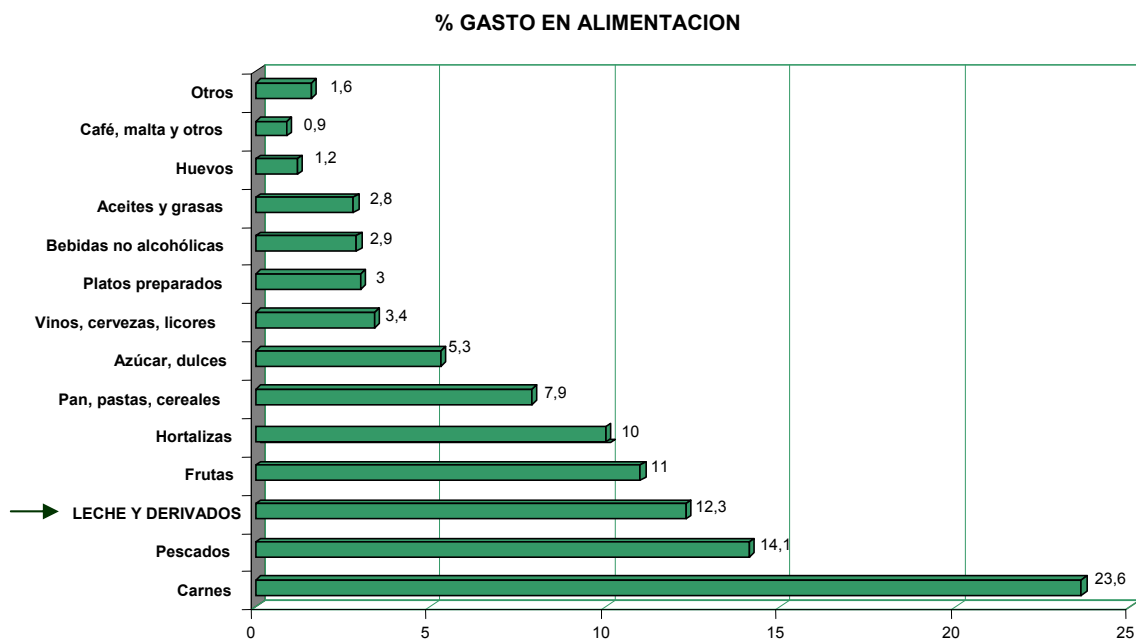
Tabla 4. PRODUCCION DE LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS EN ESPAÑA

PRODUCTO	2007
LECHE RECOGIDA	6.681.500
Vaca	5.940.300
Oveja	377.400
Cabra	363.800
LECHE DE CONSUMO	3.677.400
Pasteurizada	136.700
Esterilizada	596.600
UHT	2.944.100
LECHE CONCENTRADA	59.600
Evaporada y otras	-
Condensada	-
LECHE EN POLVO	9.400
Entera y Semidesnatada	5.600
Desnatada	3.800
OTROS PRODUCTOS EN POLVO	8.100
NATA de consumo directo	74.900
MANTEQUILLA tradicional	41.500
OTRAS GRASAS LACTEAS	13.000
QUESOS	-
De Vaca	134.200
Fresco	-
Blanco pasteurizado	106.00
Blando, semi y duro	28.200
De oveja	39.700
De cabra	14.100
De mezcla	121.00
Total quesos (excepto fundidos)	309.000
Fundidos	36.000
LECHE ACIDIFICADA	774.400
Natural	347.100
Otros (sabores, frutas...)	427.300
LECHE GELIFICADA (Postres lacteos)	202.000
LECHE AROMATIZADA (Batidos)	417.700
OTROS PRODUCTOS	38.000

Datos tomados del MAPA y FeNIL. <http://www.mapa.es>

Consumo de leche líquida y derivados lácteos

El consumo de leche líquida en España en el año 2007 se situó en 4.275,54 millones de litros, lo que supone un descenso del 3% con respecto a 2006. En consumo *per capita* fue de 98,15 litros y el gasto *per capita* 64,60 euros. En el año 2007 alrededor del 1% del gasto en alimentación de las familias españolas se destinó a la compra de este producto (Figura 3).



El descenso del consumo de leche líquida se produce principalmente en los hogares con hijos en edad escolar y mayores. La leche entera desciende en todo tipo de hogares a excepción de los jóvenes y adultos independientes la variedad de semidesnatada es la que evoluciona más positivamente, a través de hogares jóvenes donde no hay niños y en hogares de retirados (Figura 4).

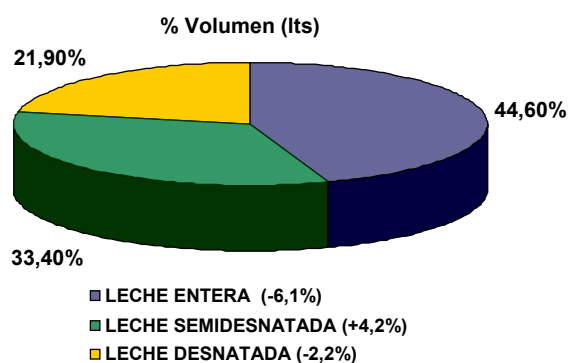
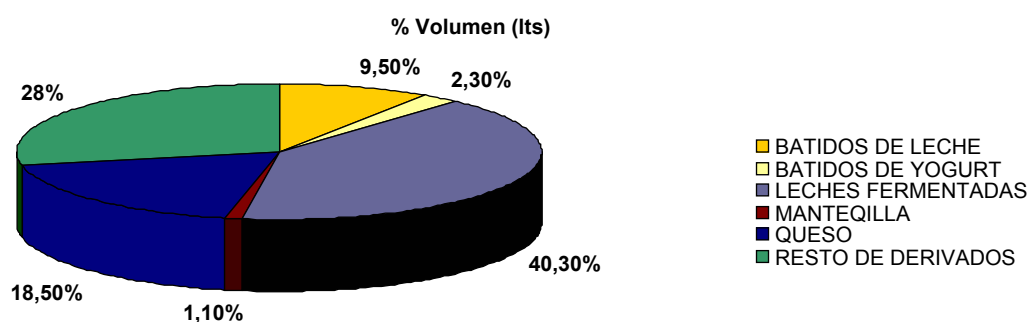


Figura 4. Consumo de leche líquida envasada en 2007: Entera, desnatada y semidesnatada. Entre paréntesis la variación con respecto al año 2006. Fuente: MAPA, La Alimentación en España 2007.

Los hogares con niños descienden su consumo de leche en general, son otros tipos de productos lácteos los que consiguen incrementar su presencia en este tipo de hogares como son los batidos de leche, batidos de yogur, leches fermentadas...El consumo de derivados lácteos per capita es de 39,71 litros/kg (Figura 5).

Figura 5. Importancia de los derivados lácteos.



Fuente MAPA, La Alimentación en España 2007

<http://www.mapa.es>

2.2 ALERGIA A ALIMENTOS. ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA.

2.2.1 Inmunidad intestinal y mecanismos de tolerancia inmunológica.

El tracto gastrointestinal es el órgano inmunológico más grande en el cuerpo. La superficie del tejido epitelial intestinal es constantemente bombardeada por miles de bacterias y de proteínas alimentarias. A pesar de esta constante exposición a antígenos alimentarios, únicamente un pequeño porcentaje de individuos son alérgicos a alimentos. Esto es debido al desarrollo de tolerancia oral a las proteínas de la dieta. La tolerancia oral, descrita por Chase en 1941¹⁰, se refiere al estado de inhibición activa de la respuesta inmune a un antígeno por medio de la exposición previa a antígeno por vía oral. La hipersensibilidad o alergia a los alimentos es una reacción adversa inmunológica que supone una respuesta anómala frente a la ingestión de los alimentos.

Los antígenos son procesados antes de que las células T respondan causando tolerancia o hipersensibilidad a los alimentos. Después de la acción de las proteasas gástricas, pancreáticas e intestinales, la mayoría de las proteínas de la alimentación se ven reducidas a una mezcla de aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos, que son absorbidos por las células epiteliales del intestino. Algunos de estos productos de la proteólisis, así como proteínas intactas que han escapado a dicho proceso pueden ser captados por diferentes células del sistema inmunológico.

Procesamiento de antígenos en el lumen.

Las proteínas ingeridas son sometidas a degradación y destrucción de sus epítopos conformacionales por el ácido gástrico y las enzimas digestivas lumenales, dando lugar, en muchos casos a la destrucción de epítopos inmunogénicos (ignorancia inmunológica). En modelos animales, se ha visto que una alteración de estos factores predispone a hipersensibilidad a alimentos más que a tolerancia¹¹⁻¹³. Otros factores importantes en la luz intestinal son el peristaltismo y la barrera mucosa que recubre el epitelio intestinal y evita el contacto de algunas proteínas.

Aquellas proteínas que escapan de la digestión y procesamiento contactan con el epitelio, el cual es un sistema inmunológico capaz de generar una gran variedad de respuestas inmunológicas.

Captación de antígenos en el intestino.

Los antígenos proteicos pueden ser captados por diferentes tipos de células, dependiendo de sus características (Figura 6).

- Placas de Peyer (PP): Son estructuras linfoides organizadas que se encuentran distribuidas a lo largo del intestino delgado y del recto. Están formadas por un centro germinal compuesto por linfocitos B rodeados de una pequeña cantidad de linfocitos T. La función de estos linfocitos B es la producción de IgA. En respuesta a una señal adecuada, los linfocitos B migran al nódulo linfático mesenterio donde se produce la maduración a precursores de células plasmáticas, que a su vez migran a la *lamina propria*, se diferencian y producen IgA dimérica¹⁴. Las células del epitelio intestinal en contacto con las PP son las células M. Estas células están especializadas en la captación de antígenos particulados para los que expresan receptores (ej. Poliovirus)¹⁵. Una vez captado, el antígeno es entregado a la región subepitelial que es rica en células dendríticas (CD), que captan el antígeno y lo presentan a los linfocitos B presentes en los folículos de las PP. El 'switching' de IgA en estas células está mediado por TGF- β producido por células T. Se cree que esto contribuye también a la tolerancia oral^{16,17} pero no se ha podido establecer su verdadera importancia.
- Células dendríticas: Las CD son importantes presentadoras de antígenos (CPA). Son muy ubicuas a lo largo de todo el tubo digestivo (PP, *lamina propria*, nódulos linfáticos mesentéricos...). Las CD juegan un papel importante en el equilibrio entre tolerancia e inmunidad activa en el intestino. Esta función depende directamente del microambiente de citoquinas y de la expresión de moléculas co-estimuladoras¹⁸. Su papel en la alergia a alimentos no está completamente establecido.
- Células epiteliales intestinales: Los antígenos solubles que han escapado a la proteólisis son captados por las células epiteliales y son transportados en microvesículas y fagosomas para ser digeridos por los lisosomas. Moléculas intactas son depositadas en el medio extracelular por exocitosis. Se piensa que un 2% aproximadamente de proteínas intactas alcanzan el sistema linfático intestinal y pasan a la circulación portal. Las células epiteliales también pueden actuar como CPA no profesionales. Expresan moléculas CMH clase II y son capaces de presentar antígenos a las células T. Al contrario que las CPA profesionales, estas células activan selectivamente células CD8+ supresoras, jugando un papel en la supresión de la respuesta inmune^{19,20}.
- Espacios paracelulares: En situación de normalidad las uniones intercelulares no permiten el paso de moléculas, incluidos pequeños péptidos o aminoácidos. En situaciones de anafilaxia se ha visto que la permeabilidad intestinal está aumentada. Este aumento de la permeabilidad no se debe únicamente al aumento de la endocitosis de moléculas, si no también a la alteración de las uniones intercelulares y apertura de espacios paracelulares²¹⁻²⁴.

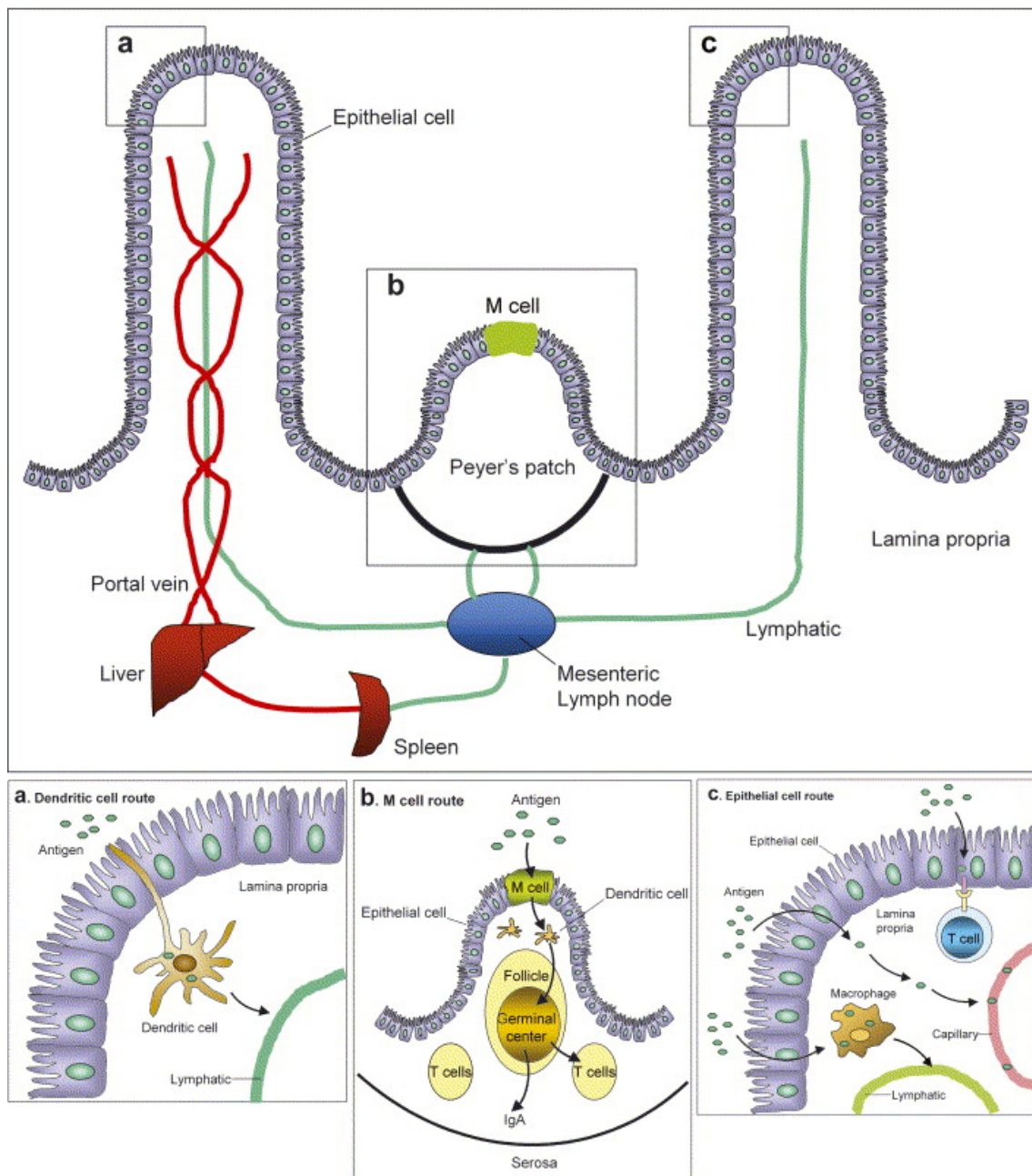


Figura 6. Zonas de captación de antígenos: **a**, los antígenos pueden ser captados por las células dendríticas y procesados en el lumen, **b**, los antígenos particulados son captados por las células M que recubren las PP y son entregados a las CD en la región sub-epitelial y posteriormente a los folículos de células B. **c**, antígenos solubles pueden atravesar el epitelio por rutas trans-celulares o para-celulares y encontrarse con células T o macrófagos en la *lamina propria* o alcanzar la circulación. Tomado de **Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities** J Allergy Clin Immunol. 2005 Jan;115(1):3-12.

Células involucradas en la inducción de tolerancia oral

En ensayos con ratones se ha visto que la tolerancia oral se puede inducir con la administración de una dosis alta de antígeno o con la administración repetida de dosis bajas. Estas dos formas de tolerancia denominadas respectivamente tolerancia de alta dosis y de baja dosis, están mediadas por diferentes mecanismos (Figura 7).

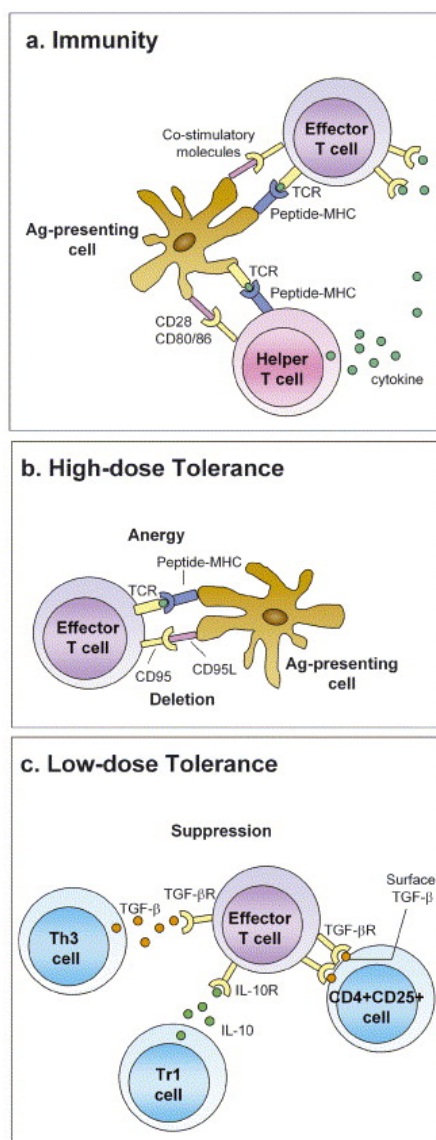
La tolerancia de alta dosis esta mediada por anergia linfocitaria o delección. Esto puede ocurrir por la unión a receptores de células T en ausencia de moléculas co-estimuladoras (como IL-2) o por medio de la interacción entre receptores co-estimuladores en las células T (CD28) y receptores en CPA (CD80 y CD86). La delección en ocurre por medio de apoptosis que puede ser bloqueada por moléculas pro-inflamatorias.

La tolerancia de baja dosis esta mediada por células T. Además de las células CD8+, diferentes tipos de CD4+ juegan un papel importante en la inducción de tolerancia: estas se pueden dividir en : T_H3 , T_R1 y $CD4^+CD25^+$.

T_H3 : Producen TGF- β y cantidades variables de IL-4 e IL-10. TGF- β podría jugar un factor fundamental en el alcance de la tolerancia inmunológica. Se ha encontrado que la expresión de TGF- β e IL-10 se encuentra disminuida en linfocitos intestinales de pacientes alérgicos a leche cuando se cultivan *in vitro* en presencia de leche. La citoquina TGF- β se expresa también en células epiteliales intestinales y se ha visto mediante tinción inmunohistoquímica que se encuentra disminuida en pacientes con alergia a múltiples alimentos.

T_R1 : Producen IL10 que a su vez aumenta la producción de estas células. IL-10 suprime las respuestas antígeno-específicas. Se ha demostrado la presencia de IL-10 en las PP de ratones tolerantes tras ser alimentados con β -lactoglobulina pero no en ratones con anafilaxia inducida por β -lactoglobulina.

$CD4^+CD25^+$: Son células indiferenciadas, con poca capacidad de proliferación y que producen IL-2. Su actividad supresora esta posiblemente mediada por la unión de TGF- β a receptores de membrana. Este tipo celular expresa el factor de transcripción FOXP3 que bloquea la respuesta TH_1 y favorece la respuesta TH_2 .



a. Una respuesta inmunologica requiere la unión de complejos alérgeno-CMH a receptores de células T en presencia de moléculas coestimuladoras apropiadas (CD80 y CD86) y de citoquinas

b. Con dosis altas de antígeno por vía oral, la unión a células T puede ocurrir en presencia de moléculas coestimuladoras o de ligandos inhibidores (CD95) que conducen a la anergia o delección.

c. Dosis bajas de antígeno vía oral dan lugar a la activación de células T reguladoras que suprimen la respuesta inmunológica por medio de citoquinas inhibitorias solubles o unidas a la membrana celular

Figura 2. Mecanismos de tolerancia oral. Tomado de Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities J Allergy Clin Immunol. 2005 Jan;115(1):3-12.

2.2.2 Definición de alergia a alimentos.

La diversidad en los mecanismos fisiopatológicos y las características clínicas, diagnósticas y pronósticas de las reacciones adversas tras la ingesta de un alimento, ha dificultado su abordaje. En el año 2003 se realizó una revisión a cargo del Comité de la Organización Mundial de Alergia²⁵. En esta última revisión, las reacciones adversas relacionadas con la ingesta de un alimento se clasifican en 3 grupos: la alergia a alimentos, la hipersensibilidad no alérgica a los alimentos (Intolerancia a alimentos) y la intoxicación alimentaria (Figura 8).

Actualmente se admite que las *reacciones alérgicas* a alimentos son aquellas reacciones adversas inducidas por alimentos en las que se demuestra la implicación de un mecanismo inmunológico. La alergia alimentaria ocurre en individuos genéticamente predispuestos en los que la tolerancia oral no se desarrolla correctamente o se rompe una vez establecida. Se diferencia una alergia a los alimentos mediada por IgE y no mediada por IgE, según los mecanismos de la respuesta inmune implicados.

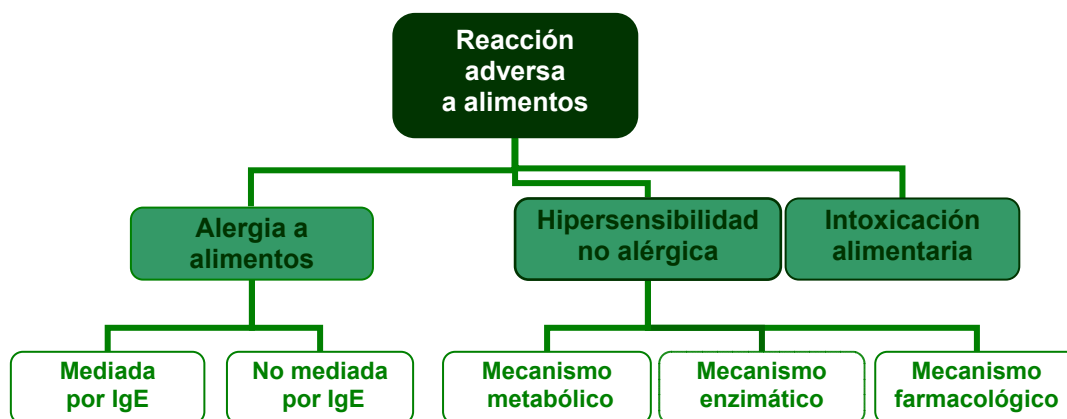
La “alergia a alimentos mediada por IgE” afectaría a pacientes que presentan anticuerpos IgE específicos, confirmados mediante pruebas in vivo o in vitro, frente a un alimento, con una correlación significativa con los síntomas del paciente y/o las pruebas de provocación. El papel de las reacciones Tipo I, mediadas por IgE, en la producción de los síntomas en la alergia a alimentos está perfectamente establecido y probado a través de estudios en los que se han realizado provocaciones orales doble ciego controladas con placebo (PODCCP).

La denominada “alergia no mediada por mecanismo IgE”, incluye aquellas reacciones causadas por otros mecanismos inmunológicos como inmunidad celular específica, inmunocomplejos, o por otras inmunoglobulinas distintas de la IgE, aunque no se ha valorado su relevancia clínica mediante provocaciones orales controladas.

Esta división en alergia mediada y no mediada por IgE, que puede ser útil desde el punto de vista académico, es excesivamente simplista para definir los diversos mecanismos patogénicos, que se activan en la respuesta inmune frente a un alimento. Hay que tener en cuenta, que sólo en las reacciones de hipersensibilidad mediada por anticuerpos de clase IgE se tienen suficientes y validadas pruebas de diagnóstico, que nos permiten reconocer el alimento implicado en la reacción y el mecanismo inmunológico subyacente. En el caso de las reacciones no mediadas por IgE, el conocimiento actual sobre su patogénesis es incompleta, y por otra parte, en ciertas entidades como la esofagitis eosinofílica o la dermatitis atópica parecen existir mecanismos patogénicos superpuestos en los que en muchas ocasiones se puede establecer una sensibilización mediada por IgE frente a determinados alimentos y un mecanismo celular, de nuevo la implicación del alimento sólo se puede realizar por la observación clínica. No tenemos pruebas de diagnóstico de estas patologías, en particular las gastrointestinales, que pongan de manifiesto el alimento y el mecanismo implicado. En este sentido, Sampson²⁶ clasifica las manifestaciones debidas a hipersensibilidad alimentaria en enfermedades IgE mediadas, parcialmente IgE mediadas y enfermedades exclusivamente

mediadas por mecanismos celulares.

Figura 8. Clasificación de las reacciones adversas a alimentos.



La *hipersensibilidad no alérgica* a los alimentos agruparía a los casos en los que la historia clínica o la provocación oral (PO) claramente confirman el papel causal de un alimento, pero no existe evidencia de un mecanismo inmunológico. Puede deberse a un mecanismo enzimático: reacción específica del huésped pero en la que no participan mecanismos inmunológicos sino ocurre como consecuencia de alteraciones o defectos en los mecanismos metabólicos, déficit de algunos enzimas (lipasa, lactasa, fructosa 1,6 fosfato...), o a un mecanismo farmacológico: causada por sustancias de los alimentos que pueden ocasionar reacciones en los individuos como cafeína, histamina etcétera.

Por último, la *intoxicación alimentaria* ocurre cuando se ingieren sustancias tóxicas que se incorporan al alimento durante su procesamiento o por contaminación, por ejemplo toxinas o bacterias presentes en el alimento.

De aquí en adelante se hará referencia a las reacciones de “alergia a alimentos mediada por IgE” debido a que el objeto de esta tesis es la patología alérgica a la leche mediada por mecanismo IgE.

2.2.3 Alimentos implicados en alergia alimentaria

Sobre la base de estudios transversales de prevalencia llevados a cabo en adultos y niños de diferentes países, se acepta generalmente que los alimentos más frecuentemente implicados en reacciones alérgicas son el huevo, la leche, el cacahuete, los frutos secos, el pescado, marisco, la soja, el trigo, las frutas y las legumbres.

La importancia relativa de los alimentos varía notablemente con la edad de los pacientes y la localización geográfica. En niños el huevo y la leche de vaca son los alimentos más frecuentemente implicados en todos los estudios. Esto concuerda con el hecho de que son los alimentos más consumidos en todo el mundo en este grupo de edad. En España se confirma esta tendencia, ya que los alimentos más frecuentemente implicados en la patología alérgica alimentaria en menores de 5 años son la leche de vaca y el huevo de gallina²⁷⁻²⁹. Sin embargo tras estos 2 alimentos hay claras diferencias entre los distintos países. En nuestro país, entre la población infantil, el tercer lugar lo ocupa el pescado, seguido de las frutas¹. Esto probablemente se debe al amplio consumo y temprana introducción del pescado en la dieta infantil en nuestro país, alimento que ni siquiera aparece en otras series (Figura 9). Otros ejemplos de diferencias debidas a las costumbres gastronómicas de cada país son, el sésamo que ocupa el 3º lugar en Israel donde es un alimento muy consumido, y el cacahuete, alimento frecuentemente responsable de reacciones alérgicas en Estados Unidos, incluso en niños pequeños, dado que la mantequilla de cacahuete es un alimento habitual en la dieta³⁰. Así pues, en alimentos cuya sensibilización se produce vía digestiva el momento de introducción de este y la frecuencia de consumo en la población parecen ser factores determinantes en la producción de alergia a dicho alimento.

A medida que la edad aumenta, el huevo y la leche van dejando paso como alimentos implicados en reacciones alérgicas a las frutas, los frutos secos y el marisco, en distinto orden en función de los hábitos alimenticios de cada país³¹⁻³⁴. Dentro de las frutas, las rosáceas, y entre ellas el melocotón figura como principal responsable de la alergia alimentaria entre los adultos^{33,34}.

2.2.4 Epidemiología.

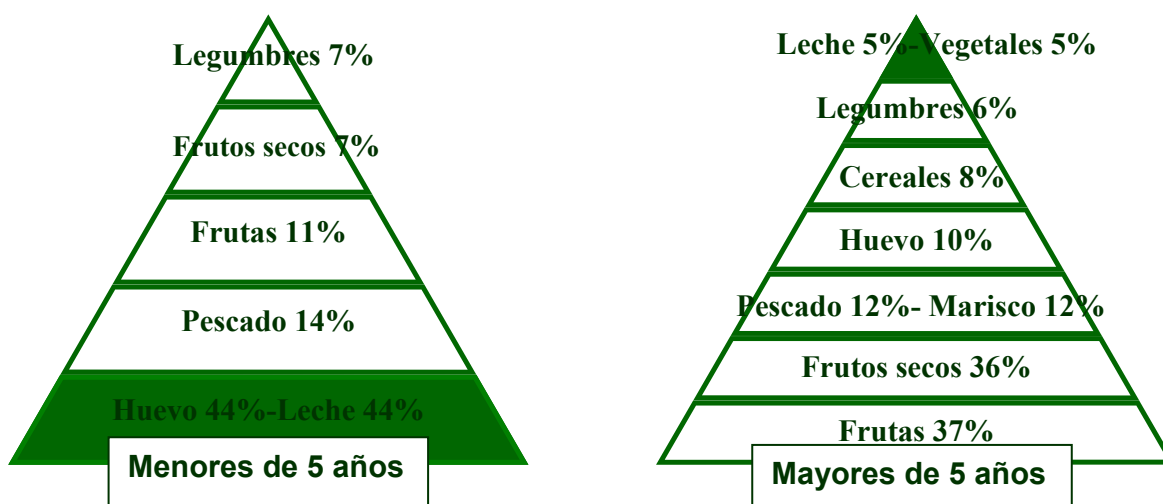
Generalmente se acepta que la alergia alimentos afecta a un 1-2% de la población general³³⁻³⁶. Las cifras de prevalencia de alergia a alimentos varían de unos estudios a otros, en función del diferente diseño empleado en su realización. Los datos son diferentes si los estudios están basados únicamente en reacciones adversas a alimentos referidas por el paciente o si se realizan pruebas para confirmar la implicación de un mecanismo IgE en la clínica del paciente, es decir, reactividad en pruebas cutáneas y/o provocaciones orales. En general existe una pobre concordancia entre estas dos aproximaciones (33). En España, en 1992 se realizó un estudio epidemiológico multicéntrico de ámbito nacional auspiciado por la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), llamado Alergológica. En él se estudiaron más de 4000 pacientes, y se recoge que el 3,6% de los pacientes derivados a consultas de alergia presentaban sensibilización a algún alimento³⁷, en la actualización de este estudio, Alergológica 2005 se encuentra un incremento del número de pacientes remitidos por esta patología³⁸.

Cuando se evalúa la población infantil de forma aislada estos porcentajes se elevan sustancialmente. Bock³⁵ publicó un estudio en 480 niños de menos de 3 años encontrando una prevalencia del 6% de alergia alimentaria, siendo la leche de vaca el alimento implicado con más frecuencia. Los alimentos son la causa más frecuente de patología alérgica en la primera infancia, y de forma casi exclusiva en los dos primeros años de vida.

En cuanto al sexo, diversos estudios realizados en adultos han puesto de manifiesto un predominio del sexo femenino en la alergia a alimentos^{1,34}.

En el caso concreto de la leche, se estima que hasta un 15% de los lactantes presentan síntomas sugestivos de alergia a la leche. Sin embargo, una revisión reciente sitúa esta prevalencia de la alergia a este alimento entre el 2 y el 3% de la población en el primer año de vida³⁹⁻⁴¹. En los niños con alimentación materna exclusiva detectan sensibilización a proteínas de leche de vaca (PLV) en un 0,5%. En nuestro país, y según diferentes autores, en el primer año de vida la alergia confirmada a la leche de vaca oscila entre 0,36 y el 1,9%, y ocupa el tercer lugar después del huevo y el pescado, como motivo de consulta por la alergia a alimentos³⁸. La aparición de alergia a la leche de vaca en la edad adulta es excepcional.

Figura 9. Prevalencia de alergia a los distintos alimentos en población infantil en España.



Datos tomados de Alergológica 2005

2.2.5 Alergenos implicados. Alergenos de la leche.

Cada alimento contiene gran número de sustancias con capacidad alergénica, si bien suele haber uno o varios alergenios principales o mayores y otros alergenios secundarios o menores, considerados así según que sean, respectivamente, alergenios a los cual responda la mayoría de los pacientes sensibilizados al alimento en cuestión, o a los que sólo responden algunos pocos individuos.

2.2.5.1 Alergenios de la leche

La leche de vaca contiene 3g de proteína/100 mL e incluye al menos 25 proteínas distintas entre séricas y caseínas⁴²⁻⁴⁴ (Tabla 5). Las proteínas de la leche son de los alergenios mejor caracterizados, se conocen la mayor parte de las variantes genéticas.

Tabla 5. Proteínas de la leche de vaca.

	Proteínas	Concentración	Peso	Nomenclatura
Caseínas 80% del total	α -caseína (s1 40% y s2 10%)	12-15 g/L y 3-4 g/L	23,6 KDa	Bos d 8
	-	-	25,2 KDa	
	28% β -caseína	9-10 g/L	23,9 KDa	
	10% κ -caseína	3-4 g/L	19,0 KDa	
Proteínas del suero 20% del total	5% α -lactoalbúmina	1-1,5 g/L	14,2 KDa	Bos d 4
	9% β -lactoglobulina	3-4 g/L	18,3 KDa	Bos d 5
	1% albúmina sérica bovina	0,1-0,4 g/L	66,3 KDa	Bos d 6
	1% Inmunoglobulinas bovinas	0,6-1 g/L	160 KDa	Bos d 7
	Lactoferrina, transferrina, lipasa, enterasa	Trazas	80 KDa	-

a. Caseínas

Las caseínas (Bos d8) son fosfoproteínas que se clasifican en función de su homología en la secuencia primaria (secuencia de aminoácidos) en las siguientes familias: α_{s1} , α_{s2} , β - y κ -caseína.

α_{s1} -caseína: constituye el 40% de la fracción caseína en la leche de vaca. Se conocen varias variantes genéticas de esta proteína. α_{s1} -CN B-8P se considera la proteína de referencia dentro de esta familia y está formada por una cadena polipeptídica simple fosforilada de 199 AAs (Asp₇, Asn₈, Thr₅, Ser₈, Ser P₈, Glu₂₅, Gln₁₄, Pro₁₇, Gly₉, Ala₉, Val₁₁, Met₅, Ile₁₁, Leu₁₇, Tyr₁₀, Phe₈, Lys₁₄, His₅, Trp₂ y Arg₆) con un peso molecular de 23,615 KDa. Cerca del 70% de la proteína no se plega, conteniendo un porcentaje pequeño de estructura secundaria⁴⁵.

α_{s2} -caseína: constituye el 10% de la fracción caseína en la leche de vaca. Hay dos componentes mayores y varios menores que se diferencian en los niveles de fosforilación post-transcripcional y en la presencia de puentes disulfuro. Las formas predominantes en la leche bovina tienen un puente disulfuro intramolecular y se diferencian únicamente en el grado de fosforilación. α_{s2} -CN A-11P es la proteína de referencia y está formada por una cadena polipeptídica simple con un puente disulfuro interno y 207 residuos de AAs: Asp₄, Asn₁₄, Thr₁₅, Ser₆, Ser P₁₁, Glu₂₄, Gln₁₆, Pro₁₀, Gly₂, Ala₈, Cys₂, Val₁₄, Met₄, Ile₁₁, Leu₁₃, Tyr₁₂, Phe₆, Lys₂₄, His₃, Trp₂ y Arg₆ con un peso molecular de 25,226 KDa.

β -caseína: constituye el 45% de la fracción caseína. β -PCN A²-5p, proteína de referencia, está formada por una cadena polipeptídica de 209 AAs: Asp₄, Asn₅, Thr₉, Ser₁₁, Ser P₅, Glu₁₉, Gln₂₀, Pro₃₅, Gly₅, Ala₅, Val₁₉, Met₆, Ile₁₀, Leu₂₂, Tyr₄, Phe₉, Lys₁₁, His₅, Trp₁ y Arg₄ con un peso molecular de 23,983 KDa. A pesar de su poca homología comparte una estructura similar con α_{s1} -caseína.

K-caseína: constituye el 12% de la fracción caseína. Se presenta en forma de polímeros (desde dímeros hasta octámeros) unidos por puentes disulfuros. Es la única fracción glicosilada. Está formada por 169 AAs: Asp₄, Asn₈, Thr₁₅, Ser₁₂, Ser P₁, Pyroglu₁, Glu₁₂, Gln₁₄, Pro₂₀, Gly₂, Ala₁₄, Cys₂, Val₁₁, Met₂, Ile₁₂, Leu₈, Tyr₉, Phe₄, Lys₉, His₃, Trp₁ y Arg₅ con un peso molecular de 19,037 KDa⁴⁶.

b. Proteínas del suero.

El término proteínas del suero se emplea para designar aquellas proteínas que permanecen solubles después de la precipitación de las caseínas a pH 4.6 y 20°C. Los componentes mejor caracterizados son α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina sérica e inmunoglobulinas. De ellas, son considerados alérgenos mayoritarios la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina^{47,48}.

β -lactoglobulina (Bos d5): Es la proteína mayoritaria del suero. Se presenta en forma de dímero, con una longitud de 162 AAs: Asp₁₀, Asn₅, Thr₈, Ser₇, Glu₁₆, Gln₉, Pro₈, Gly₄, Ala₁₅, Cys₅, Val₉, Met₄, Ile₁₀, Leu₂₂, Tyr₄, Phe₄, Lys₁₅, His₂, Trp₂ y Arg₃ con un peso molecular de 18,277 KDa. Su estructura está estabilizada por dos puentes disulfuro que incrementan su

estabilidad. Es una proteína globular que pertenece a la familia de las lipocaínas y comparte con ellas estructura secundaria y terciaria (barril β) y la capacidad de unir pequeñas moléculas hidrofóbicas.

α -lactoalbúmina (Bos d4): Es también una proteína globular con una longitud de 123 AAs: Ala₃, Arg₁, Asn₈, Asp₁₃, Cys₈, Glu₇, Gln₆, Gly₆, His₃, Ile₈, Leu₁₃, Lys₁₂, Met₁, Phe₄, Pro₂, Gly₄, Ser₇, Thr₇, Trp₄, Tyr₄ y Val₆, con un peso molecular de 14,178 KDa. Comparte un 40% de homología con la lisozima pero sin capacidad de hidrolítica. Tiene 4 puentes disulfuro que le confieren gran estabilidad.

2.2.6 Manifestaciones clínicas de la alergia a alimentos. Manifestaciones de la APLV.

Manifestaciones clínicas de la alergia a alimentos.

La piel es el órgano diana en las reacciones de hipersensibilidad a alimentos. Los síntomas cutáneos son las manifestaciones más frecuentes en la patología alérgica alimentaria, junto con la clínica digestiva^{1,49,50}. La clínica cutánea puede presentarse como única manifestación de una reacción alérgica alimentaria o puede formar parte de una reacción generalizada, acompañándose de manifestaciones digestivas, oculares, respiratorias o incluso participando de un shock anafiláctico propiamente dicho⁵¹ (Figura 10).

a. Manifestaciones cutáneas

Los trastornos alérgicos alimentarios mediados por IgE pueden manifestarse a nivel cutáneo como urticaria y/o angioedema agudos. Existen otras manifestaciones clínicas a nivel cutáneo relacionadas con la alergia a alimentos y mediadas por otros mecanismos fisiopatológicos, como la dermatitis de contacto⁵²⁻⁵⁴. Por otra parte, el papel de la alergia a alimentos en la patogénesis de otras manifestaciones cutáneas como la dermatitis atópica es aún controvertido⁵⁴.

Figura 10. Manifestaciones clínicas de la alergia a alimentos mediada por IgE.

La manifestación cutánea más frecuente es la urticaria aguda, que puede ir acompañada o no de angioedema. La urticaria se presenta desde el 30%⁵⁰ hasta el 60% de pacientes alérgicos a alimentos⁴⁹, siendo en alrededor del 44% de los pacientes manifestación clínica aislada sin acompañarse de afectación de otros órganos. A su vez, en la población infantil la primera causa de urticaria / angioedema de mecanismo IgE mediado son los alimentos⁵⁵.

La urticaria de contacto por proteínas de alimentos también es una manifestación clínica frecuente. Suele presentarse como edema y eritema local en la zona de contacto, a los pocos minutos, pero en ocasiones los síntomas pueden generalizarse apareciendo urticaria generalizada, síntomas respiratorios e incluso anafilaxia.

La urticaria crónica, es una patología claramente más prevalente entre los adultos que en la población infantil. En raras ocasiones este está relacionado con un alérgeno alimentario⁵⁶⁻⁵⁹. A pesar de ello, se han descrito algunos casos de urticaria crónica causada o agravada por alérgenos alimentarios ocultos o por sensibilización a varios alimentos⁶⁰.

b. Reacciones gastrointestinales inmediatas

La clínica digestiva inmediata junto con la clínica cutánea forman el patrón típico de presentación de la alergia alimentaria IgE mediada^{61,62}. Aparece típicamente entre pocos minutos y las 2 horas tras la ingesta del alimento. Dentro de dichas manifestaciones se incluyen náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea⁶³. Aunque esta clínica puede aparecer de

forma aislada, habitualmente aparece asociada a clínica a nivel de otros órganos, predominantemente cutánea, aunque también respiratoria, ocular o incluso en el contexto de una anafilaxia⁶².

El Síndrome de Alergia Oral (SAO) podría considerarse como el equivalente de la urticaria aguda de contacto a nivel orofaríngeo. Al contrario de lo que sucede con la alergia a la leche y al huevo, la prevalencia de este síndrome aumenta con la edad, adquiriendo mayor importancia). Típicamente es producido por la toma de frutas y vegetales crudos⁶⁴ entre los niños escolares y los adolescentes con respecto a la primera infancia. Clínicamente se manifiesta como prurito orofaríngeo, acompañado generalmente de eritema y angioedema perilabial de forma inmediata tras la ingesta. Puede acompañarse de edema lingual e incluso edema de úvula con el consiguiente compromiso respiratorio.

c. Manifestaciones respiratorias de la alergia a los alimentos

La sintomatología respiratoria es menos frecuente que la clínica dermatológica y digestiva, y usualmente se asocia a cuadro generalizado de anafilaxia. La incidencia de sintomatología respiratoria inducida por alergia a alimentos, según Onorato y Nekam^{65,66} se estima entre un 2 y 8% en niños que previamente presentaban asma bronquial.

La rinitis es un síntoma que raramente aparece aislado. Si bien, es el síntoma respiratorio más frecuente, se estima que hasta en un 70% de los síntomas respiratorios correspondían a rinitis en provocaciones orales a alimentos⁶⁷. Al igual que la rinitis, el asma bronquial aislada no suele ser frecuente como síntoma único de alergia alimentaria. Hay estudios que sugieren que la sintomatología respiratoria como respuesta a una sensibilización alimentaria es mucho más frecuente en niños que presentan previamente asma bronquial y dermatitis atópica^{68,69}.

d. Anafilaxia inducida por alergia a los alimentos

La alergia alimentaria es la principal causa de reacciones anafilácticas tratadas en los servicios de Urgencias hospitalarias⁷⁰⁻⁷⁴. Aunque cualquier alimento puede provocar una reacción alérgica, ciertos alimentos han sido citados más frecuentemente como una causa de anafilaxia grave o mortal, como cacahuetes, nueces, y mariscos, ocupando un segundo lugar leche, huevo, pescado, y otros^{72,75}.

Existen algunos factores de riesgo que hacen que sean más frecuentes las reacciones anafilácticas, como la presencia de asma bronquial previa, la incapacidad para reconocer la gravedad de las reacciones por negación de los síntomas o por presentación "atípica", ingestión inadvertida de alergenocultos en alimentos procesados⁷⁶, así como tratamientos inadecuados como la escasa utilización de adrenalina por los médicos de los servicios de Urgencias hospitalarios, que emplean habitualmente corticoides y antihistamínicos^{71,74,77,78}.

2.2.6.2 Manifestaciones clínicas de la APLV.

La aparición de los síntomas suele coincidir con la introducción de la lactancia artificial, tras un periodo de lactancia materna en los primeros meses de vida. Los síntomas pueden aparecer incluso con la primera toma. Si el niño tolera bien los primeros biberones, el intervalo entre el intervalo entre el comienzo de la alimentación artificial y la aparición de síntomas, no suele superar la primera semana. Los síntomas comienzan en la primera hora de la toma de fórmula láctea, a veces sólo en unos minutos.

La clínica más frecuente con la que se manifiesta la alergia a la leche es la cutánea. La mayoría de los alimentos implicados en reacciones alérgicas producen indistintamente urticaria y/o angioedema. Eseverri⁷⁹ en 1999, en un estudio sobre urticarias mediadas por IgE concluyen que el huevo, la leche y el pescado reaccionaron mayoritariamente como urticaria aislada, mientras que en el caso de los frutos secos se observa un predominio de la asociación urticaria-angioedema. En los individuos alérgicos, además de por ingestión, la leche puede producir síntomas por contacto directo o indirecto y también por inhalación, como puede suceder en los niños con anafilaxia o en los adultos con alergia ocupacional. El huevo y la leche en la población pediátrica, se suman a la lista de alimentos más frecuentemente implicados en la urticaria de contacto en el adulto (pescados, mariscos, frutos secos, frutas y verduras)^{80,81}.

La clínica digestiva inmediata junto con la clínica cutánea forman el patrón típico de presentación, fundamentalmente en cuanto a epigastralgia, vómitos o diarrea, no siendo tan frecuente como en el caso de los vegetales el Síndrome de Alergia Oral^{49,64}.

La sintomatología respiratoria secundaria a la ingesta de leche, es menos frecuente que la clínica dermatológica y digestiva, y usualmente se asocia a cuadro generalizado de anafilaxia. Si bien la leche, junto con los frutos secos y el huevo, son los alérgenos que más frecuentemente se han implicado en la rinitis y el asma bronquial inducida por sensibilización a alimentos^{68,69}.

Por último, este alimento, ocupa, junto con el huevo y el pescado, el segundo lugar en cuanto a alimentos responsables de reacciones anafilácticas graves o mortales, por detrás de los cacahuetes, nueces y mariscos^{71-74,77,82}.

2.2.7 Diagnóstico de la alergia a alimentos. Diagnóstico de la APLV. Aplicación de los microarrays en el diagnóstico de la alergia a alimentos.

Las técnicas de diagnóstico disponibles en la práctica clínica habitual en alergia se desarrollaron a lo largo del siglo XX. El pionero en la investigación en alergología fue Charles Backley a finales del siglo XIX. Preparó extractos alergénicos de pólenes y durante años ensayó aplicándolos en la nariz, la conjuntiva o la piel. Encontró también una relación directa entre el número de granos de polen contabilizados en el microscopio y la intensidad de los síntomas observados en el sujeto. De las observaciones de Backley ha sido de gran importancia para el diagnóstico el constatar la inducción de un habón y eritema tras la aplicación epicutánea del polen. Esto ha derivado en lo que posteriormente se han denominado pruebas epicutáneas o “prick test” que constituyen aún hoy en día un pilar fundamental en el diagnóstico alergológico. La posibilidad de identificar pacientes sensibilizados mediante pruebas de exposición condujo al primer intento de desarrollar por parte de Noon y Freeman una inmunoterapia específica que, aunque con la creencia falsa de considerar que la rinitis estaba producida por una “toxina” del polen, observando la adquisición de tolerancia que se mantenía tras interrumpir el tratamiento.

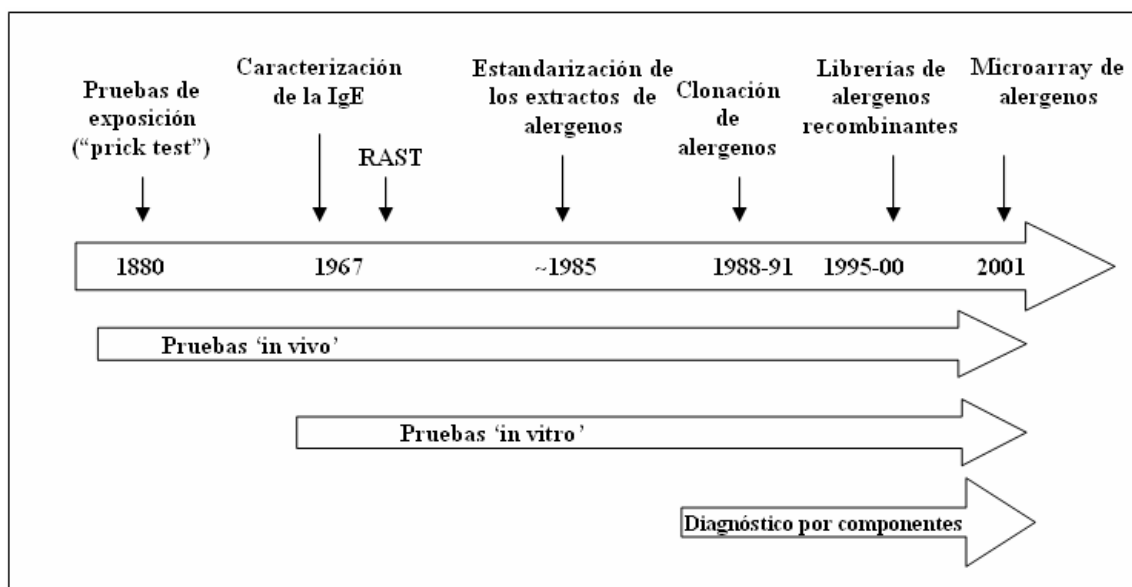
Prausnitz y Küstner en 1920⁸³ demuestran que en el desarrollo de la respuesta alérgica están implicadas inmunoglobulinas. Inyectaron suero de Küstner, alérgico a pescado, en el antebrazo de Prausnitz transfiriéndole de este modo la sensibilidad al extracto de pescado. No obstante fue 50 años más tarde, en 1967, cuando Ishizaka (confirmado con experimentos de Johansson y Bennich) caracterizó la molécula responsable, denominándola IgE⁸⁴. En ese mismo año se dispuso del primer RAST (radioallergoabsorbent test).

A mediados de los años 80 se hace un intento por estandarizar los extractos alergénicos en función del alérgeno mayoritario, lo cual incrementa la calidad de los mismos. En los años 90 se clonan los primeros alérgenos, lo que nos lleva a disponer de extensas librerías de alérgenos recombinantes para diagnóstico. Esto crea la necesidad de nuevas técnicas de análisis masivo y simultáneo. El objetivo es pasar del diagnóstico basado en extractos alergénicos (formados por conglomerados de moléculas alergénicas y no alergénicas) al “diagnóstico por componentes”, es decir, establecer exactamente la molécula alérgica causante de la reacción⁸⁵. Esto es de gran importancia, debido a las limitaciones de los extractos alergénicos actuales. Estas son las dificultades de estandarización (expresión de alérgenos en ciertas condiciones de maduración del alérgeno, contaminación, infra-representación o degradación de alérgenos importantes) y el identificar la fuente alérgica y no las moléculas responsables de la reacción dificulta por ejemplo distinguir entre fenómenos de reactividad cruzada vs co-sensibilización.

En la práctica clínica habitual se dispone de extractos alergénicos para la realización de

pruebas cutáneas y técnicas de laboratorio para detectar niveles de IgE específica y total. La figura 11 recoge la evolución de las pruebas diagnósticas a lo largo del tiempo⁸⁶. En los dos primeros apartados de este capítulo se resumirán las pruebas empleadas en la práctica clínica habitual y en el último se introducirán los ensayos microarray, su aplicación en el campo de la inmunología y en concreto en el estudio de la alergia a alimentos y en concreto su utilidad en el diagnóstico de la APLV, objeto de la presente memoria.

Figura 11. Evolución histórica del diagnóstico en alergia.



2.2.7.1 Diagnóstico de la alergia a alimentos.

El objetivo fundamental en el diagnóstico de las reacciones alérgicas a alimentos mediadas por IgE es el establecimiento de una asociación causal entre el alimento y las manifestaciones clínicas referidas por el paciente (que se recogen mediante la historia y la exploración clínica inicial) y la identificación del mecanismo IgE subyacente^{87,88} (mediante pruebas cutáneas y/o determinación de IgE sérica específica).

a. Historia Clínica

La historia clínica que se le realiza al paciente o a sus familiares es la herramienta muy útil en el diagnóstico de alergia a alimentos. Cuando la reacción se desencadena de forma aguda o anafiláctica tras la ingestión de un único alimento de forma aislada, la historia personal tiene un valor predictivo mucho más alto que en el caso de manifestaciones crónicas (dermatitis atópica, gastroenteropatías eosinofílicas,...). El Comité de Reacciones Adversas a Alimentos de la SEAIC en 1999⁸⁹, estableció de forma concreta y clara los puntos fundamentales que hay que abordar en la historia clínica cuando existe una sospecha de alergia mediada por IgE a algún alimento (Tabla 6).

Tabla 6. Datos de interés en la anamnesis ante la sospecha de una reacción alérgica mediada por IgE a un alimento.

Alimento	Identificación	Sospecha de los padres
		Alergenos ocultos (pensar leche, huevo en niños)
		Consumo a la vez de varios alimentos
		Contaminación
		Diario dietético
	Cantidad	
Reacción	Forma de preparación	
	Clínica con manipulación / inhalación	
	Consumo posterior del alimento (en la misma o distinta forma de preparación)	
	Tiempo de latencia desde la ingesta	
	Descripción de síntomas	
	Duración de los síntomas	
Paciente	Necesidad de tratamiento, atención en Urgencias	
	Nº de episodios	
	Frecuencia de los episodios	
	Fecha del último episodio	
	Edad	Edad actual
		Edad en el inicio de la clínica
	Estado del paciente en el Momento de la reacción	Estado de salud
		Tratamientos
		Ejercicio físico
	Dermatitis atópica	
	Otras enfermedades alérgicas (alergia a otros alimentos, rinoconjuntivitis/asma alérgico)	
	Otras enfermedades no alérgicas	
	Antecedentes familiares (dermatitis atópica, enfermedades alérgicas)	

Fuente: SEAI⁸⁹.

Habitualmente el paciente o los familiares pueden reconocer el alimento causante de la reacción mediada por IgE. En la primera infancia la introducción cronológicamente pautada de los alimentos facilita la identificación del alimento responsable. En ocasiones los desencadenantes de las reacciones pueden estar ocultos (productos manufacturados pueden llevar proteínas de huevo o leche (aglutinantes, etc.)⁹⁰. También hay que investigar sobre los alimentos que el paciente ha comido al mismo tiempo o sobre la posible contaminación (por haber estado en contacto con otro, o haberse cocinado con los mismos utensilios con los que se han cocinado otros).

Debe registrarse la cantidad del alimento con la que el paciente presentó síntomas. Se necesita superar una determinada cantidad umbral para que se manifieste la clínica (dosis umbral), cantidad que dependerá del grado de sensibilización del paciente y la potencia alérgica del alimento. Se debe recoger también la forma de preparación del alimento con el que presentó la reacción, ya que la alergenidad de algunos alimentos es diferente si se ingiere el alimento crudo o cocinado, o si se come completo o sólo una parte.

Se debe realizar una rigurosa descripción de la sintomatología. Debe evaluarse la gravedad de la reacción, ya que la intensidad de los síntomas no predice el pronóstico pero sí se relaciona

con el grado de sensibilización del paciente y posibles riesgos en sucesivas exposiciones al alimento. Se debe recoger el tiempo de latencia entre la ingesta y la aparición de los síntomas. Es característico que este, en las reacciones mediadas por IgE, sea menor de dos horas. Se recogerá la frecuencia de los episodios alérgicos y su distribución en el tiempo. Esta información puede resultar útil en la identificación del alimento implicado. El tiempo transcurrido desde el último episodio es especialmente importante en los niños pequeños, ya que la evolución natural de esta enfermedad es el desarrollo de la tolerancia después de una dieta de exclusión, y este dato puede orientarnos en cuanto al momento evolutivo en el que está el paciente.

En cuanto a los datos del paciente, se debe recoger la edad actual y de comienzo de sintomatología. También hay que investigar las circunstancias en las que se desarrolló la reacción: el estado de salud del paciente, tratamientos farmacológicos, ejercicio físico y otras circunstancias ambientales y emocionales coincidentes en el momento del episodio.

Debe interrogarse acerca de antecedentes familiares y personales de otras enfermedades atópicas (dermatitis atópica, rinitis, asma).

b. Detección de IgE específica

Para la detección de IgE específica frente al alimento implicado disponemos de métodos *in vivo* e *in vitro*. Estas técnicas se basan en la utilización de extractos alergénicos y su rentabilidad depende de la calidad de los mismos.

Factores que afectan la calidad de un extracto alergénico de alimentos.

Un extracto alergénico es un producto biológico resultante de la extracción de los componentes alergénicos del alimento. Existen diferentes tipos de extractos: extractos naturales parcialmente purificados y extractos purificados que se pueden obtener a partir del aislamiento de la fuente natural o a través de técnicas recombinantes. Los extractos naturales parcialmente purificados se obtienen a partir de una fuente natural por medio de la extracción del material alergénico. Cuando a partir de un extracto natural se identifican los componentes antigénicos y se aíslan mediante un proceso de purificación obtenemos los alérgenos naturales purificados. Su calidad depende de la rentabilidad del proceso de purificación y su rendimiento diagnóstico está condicionado por la importancia de dicho alérgeno en el extracto.

Hay muchos factores que durante el proceso de producción del extracto pueden afectar a la calidad del producto final. La selección de la fuente apropiada de material alergénico es fundamental. Cuando existen varias disponibles para un mismo alérgeno se debe emplear la más relevante alérgicamente. Un problema importante es la variabilidad alérgica de las variedades de la misma especie⁹¹⁻⁹³. El grado de maduración y el almacenamiento también

pueden influir en el contenido de alergen mayoritarios. Una posible solución a este problema podrían ser los alergen recombinantes, que son alergen bien definidos, en cantidades conocidas, bien estandarizados, con ausencia de productos indeseables, que se obtienen por recombinación de ácidos nucleicos in vitro. Requiere que previamente se hayan identificado los alergen. Entre sus muchas ventajas destaca que es un material reproducible, muy bien definido, no expuesto a la variabilidad biológica⁹⁴.

Estudio in vivo: Pruebas cutáneas.

La prueba cutánea en “prick”.

El método de elección para demostrar en un paciente una sensibilización mediada por IgE a un alimento determinado es la prueba cutánea mediante la técnica de prick. Para su realización se siguen las normas aceptadas internacionalmente^{94,95}.

La prueba cutánea en “prick” es una técnica sencilla, barata, segura y reproducible y permite una evaluación rápida del paciente para explorar la existencia de sensibilización a diversos alimentos. En general es una prueba de una alta sensibilidad, un resultado negativo prácticamente excluye la posibilidad de aparición de síntomas en la prueba de provocación^{96,97}, pero una prueba cutánea positiva es sólo sugestiva de una respuesta IgE frente a ese alimento, y su interpretación debe supeditarse a la historia clínica y en la mayoría de las ocasiones, al resultado de la provocación oral. En los casos de una reacción anafiláctica tras la ingestión de un alimento aislado, o de reacciones recientes y repetidas con un mismo alimento, una prueba cutánea positiva se considera de valor diagnóstico definitivo^{89,96,98}. El “prick” es una prueba con una alta sensibilidad pero su sensibilidad puede disminuir porque se utilice un extracto de mala calidad, tenga poca cantidad de alergen mayor o que se haya degradado por la manipulación del alergen en la preparación del extracto.

Método prick-prick.

Cuando la historia es muy sugestiva de alergia y si se obtiene una prueba cutánea negativa, se debe repetir la prueba cutánea con el alimento fresco antes de concluir que no se detecta IgE específica. Para su realización se utiliza el alimento el fresco. Se punciona primero con la lanceta el alimento y a continuación la piel del paciente⁹⁹. Es un método sencillo, reproducible, garantiza que los alergen están presentes y aumenta la sensibilidad cuando se trata de estudiar alimentos cuyo contenido antigénico es lábil (hortalizas, frutas frescas, etcétera), situación en la que los extractos comerciales son menos útiles⁹⁹⁻¹⁰².

Estudio *in vitro*: detección de IgE específica frente a alergenitos alimentarios.**Determinación de IgE específica sérica.**

Existen diversas técnicas para la determinación de IgE específica sérica (radioisotópicas, inmunoenzimáticas, colorimétricas, fluorométricas y quimioluminescentes) en las que el alérgeno puede encontrarse en fase líquida o sólida., pero en la actualidad el método más comúnmente utilizado es un método fluorimétrico (CAP Pharmacia) (ver descripción en apartado Material y Métodos).

Al igual que en las pruebas cutáneas, existe una variabilidad en su utilidad clínica en función de la naturaleza del alimento y de la procedencia del extracto⁹³. Su rentabilidad diagnóstica es buena para alimentos como la leche, el huevo, cacahuete y pescado¹⁰³⁻¹⁰⁶ y más baja para frutas frescas y vegetales¹⁰².

La determinación de IgE específica debe ser utilizada en conjunción con la historia clínica. En la práctica clínica las pruebas cutáneas en “prick” y la determinación de IgE específica son pruebas que se utilizan de forma conjunta. La determinación de IgE específica se considera una alternativa a las pruebas cutáneas cuando no es posible la realización de éstas (enfermedad dermatológica grave, dermatografismo, etcétera) o en el caso de reacción sistémica. Sin embargo, es una técnica más cara y los resultados no están disponibles en el momento. Algunas de las ventajas de esta prueba sobre la cutánea es que se pueden realizar múltiples determinaciones con una única muestra de suero y si se utiliza un mismo método de determinación de IgE específica los resultados son cuantitativamente comparables entre diferentes laboratorios y a lo largo del tiempo, por lo que es una herramienta útil en investigación⁸⁹.

c. Otras pruebas diagnósticas**Pruebas epicutáneas**

La prueba epicutánea o prueba del parche se ha utilizado para el diagnóstico de la dermatitis de contacto con una buena rentabilidad diagnóstica. En el caso de las reacciones mediadas por anticuerpos de clase IgE, no existe una adecuada estandarización de esta prueba en lo referente a los extractos que se deben utilizar, ni de su metodología, y en cuanto a su utilidad en el diagnóstico de estas patologías su rendimiento es aún controvertido, pudiendo resultar útiles en las reacciones tardías (exacerbación de la dermatitis atópica, síntomas digestivos tardíos, etcétera)^{107,108}.

Dieta de eliminación.

La exclusión de la dieta del alimento sospechoso de causar la reacción es el primer paso a seguir en la confirmación del diagnóstico. Si la clínica es de aparición inmediata (reacciones mediadas por IgE), la relación causa-efecto es fácil de establecer, por lo que el paciente suele evitar su ingestión con posterioridad.

Hay que tener en cuenta que una mejoría clínica con la dieta de exclusión de un determinado alimento no siempre implica que el paciente sea alérgico a ese alimento. Por ejemplo, los niños con intolerancia a la lactosa mejoran con dietas de exclusión y sustitución de la leche de vaca por fórmulas hidrolizadas de proteínas o soja. Aunque se produzca una mejoría clínica con la dieta de exclusión, nunca es diagnóstica de forma aislada. Las dietas de exclusión con fines diagnósticos deben seguirse de la realización de una provocación controlada con el alimento.

d. Pruebas de provocación controlada con alimentosProvocación oral (PO) con alimentos

La prueba de provocación controlada con el alimento implicado en la reacción y al que el paciente está sensibilizado es el procedimiento definitivo para confirmar o descartar el diagnóstico de alergia clínica a un alimento. A pesar de que es una prueba con cierto peligro, dado los beneficios que aporta un resultado negativo, el riesgo a asumir es razonable cuando se realiza bajo las condiciones adecuadas¹⁰⁹.

El objetivo de la PO es confirmar o descartar la reactividad del paciente frente a un alimento. Se trata de inducir la menor reacción posible en el paciente que confirme el diagnóstico. Previo a su realización siempre es necesario que el paciente firme un consentimiento informado.

El Comité de Reacciones Alérgicas a Alimentos de la SEAIC⁸⁹, propuso algunas directrices sobre la metodología y aplicación de las pruebas de provocación, y recientemente la Academia Europea de Alergología e Inmunología clínica ha publicado un documento con las guías para la realización de las provocaciones en pacientes con reacciones preferentemente mediadas por IgE¹¹⁰. Las indicaciones y contraindicaciones de la PO se recogen en la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7. Indicaciones y contraindicaciones de la PO.

Indicaciones de la PO	Contraindicaciones de la PO
Pacientes de cualquier edad con una historia de reacción adversa frente a un alimento	Paciente que no pueda recibir tratamiento con adrenalina incluidos los pacientes que requieran tratamiento con beta-bloqueantes.
Establecer o excluir el diagnóstico de hipersensibilidad a alimentos antes de instaurar una dieta de exclusión prolongada.	Embarazo.
Valorar la aparición de tolerancia a lo largo de la evolución de la enfermedad. Hay que tener en cuenta que, al menos en niños, es frecuente la evolución a la tolerancia en el tiempo y por lo tanto el diagnóstico debe reconsiderarse periódicamente.	Anafilaxia: <ul style="list-style-type: none"> Adultos con una clínica clara de anafilaxia o reacción sistémica grave con uno o más alimentos con estudio alérgico positivo y concordante. Niños pequeños si la historia de anafilaxia es reciente. Ya que la evolución natural de alergia a la mayoría de los alimentos en niños es hacia la tolerancia, la contraindicación sería durante un periodo variable de tiempo.
Después de dietas de exclusión insuficientemente documentada del alimento pero que se sospecha que puede ser posible una reacción adversa.	
Se detecte sensibilización a un alimento y se desconoce la tolerancia por parte del paciente.	En casos seleccionados en los que los resultados de la determinación de IgE específica hace innecesaria la provocación. Según se ha indicado anteriormente, los puntos de corte del prick o la IgE específica que puede predecir una provocación positiva son muy variables y dependen de diversos factores como del alimento implicado, edad del paciente, momento evolutivo, manifestación clínica etc.
Si se sospecha que un síntoma crónico puede estar relacionado con un alimento.	
Pacientes sin historia clínica específica de reacción adversa previa para un alimento.	
Investigación.	

En algunos casos la prueba de provocación no es necesaria para el diagnóstico:

- 1 En los casos de clínica anafiláctica o sistémica grave, con clara relación con el/los alimentos y estudio alérgico positivo y concordante.
- 2 Si la clínica es sugestiva, repetida y reciente (12-18s meses desde el último episodio en niños) ^{111,112} con estudio alérgico positivo y concordante.

La realización de la PO debe cumplir una serie de condiciones, unas dependientes del paciente y otras del centro de realización que se detallan a continuación (Tabla 8).

Tabla 8. Condiciones para la realización de una PO.

Dependientes del paciente	Dependientes del centro
Paciente sin ninguna enfermedad concomitante y asintomático desde el punto de vista alérgico. En pacientes asmáticos debe realizarse, en fase estable, con cifras de FEV1 de al menos el 80% de su teórico, con control espirométrico o de pico flujo que en el caso de reacciones tardías se prolongará 8 horas.	Personal entrenado en la realización de PO y en el tratamiento de reacciones alérgicas
Suspender la medicación que pueda enmascarar, atrasar, aumentar o evitar las reacciones alérgicas o interferir en el tratamiento de las reacciones (antihistamínicos, neurolépticos, esteroides orales (más de 5mg/día), AINES, inhibidores de la ECA, beta-bloqueantes.	Disponer de equipos de reanimación para el control y tratamiento de posibles reacciones graves (incluida adrenalina y oxígeno) y en lugares ubicados cerca de una unidad de cuidados intensivos y si es posible libre de látex.
Realizar una dieta de eliminación previa del alimento implicado.	Coger una vía intravenosa antes de iniciar la provocación. Sobre todo en adultos que puedan presentar una reacción grave. En niños pequeños sólo es necesario en casos concretos en el que se prevea que existe un riesgo importante.
Informar y obtener el consentimiento informado por el paciente y /o sus tutores.	En la mayoría de los casos se puede realizar de forma ambulatoria con observación de, al menos, dos horas después de la última dosis, pero puede variar según la clínica. Si la reacción ha sido grave se debe dejar al paciente en observación hospitalaria durante varias horas.

Procedimiento de la provocación

El paciente debe estar en ayunas⁸⁹. El alimento debe administrarse comenzando por una cantidad inferior a la que supuestamente originó la reacción y además se recomienda comenzar por debajo de las “dosis umbral” con la que reaccionan la mayoría de los pacientes, referida en la literatura (105, 114). Los incrementos de dosis pueden ser duplicando la dosis o aumentando de forma logarítmica (1, 3, 10, 100 etc.).

En los casos de reacciones inmediatas se recomienda un intervalo entre las dosis de 15-30 minutos, pero puede variar según la clínica. Los intervalos tienen que ser superiores al periodo de latencia con que apareció la reacción.

El resultado es positivo si el paciente presenta clínica compatible con alergia. Una provocación positiva debe ser tratada precozmente sin esperar a que desarrolle el cuadro clínico completo, con adrenalina intramuscular o subcutánea y reposición de volumen, acompañado de otras medidas comunes en el tratamiento de la anafilaxia. Si el paciente no presenta clínica se completará la provocación con cantidades adecuadas para la edad del paciente.

Material para provocación

El material para las provocaciones no está estandarizado. El alimento puede administrarse en su forma natural o en forma liofilizada¹¹³, tanto cuando se utiliza en abierto como en forma enmascarada. Como placebo se utilizará el vehículo con el que se ha enmascarado el alimento. Las recetas de enmascaramiento del alimento para provocación en ciego deben estar validadas por procedimientos estadísticos como son el dúo-test y el triángulo-test, en base a encontrar diferencias en las características organolépticas de dos o tres muestras^{113,114}. Existen diferentes recetas para enmascarar algunos alimentos. El Comité de Alimentos de la SEAIC ha recopilado las diversas recetas utilizadas por los investigadores españoles y se está procediendo en la actualidad a su validación¹¹⁴.

Tipos de provocación e indicaciones

Puede realizarse provocación oral abierta (el paciente y el médico evaluador conocen el contenido de la provocación), simple ciego frente a placebo (sólo el evaluador conoce el contenido) o doble ciego frente a placebo (ni el paciente ni el evaluador conocen el contenido de la provocación). La provocación oral doble ciego controlada con placebo se acepta como la prueba patrón oro en el diagnóstico de las reacciones adversas a alimentos^{89,98,99,102,110,114}. Sin embargo implica un alto coste sanitario y social, ya que requiere la colaboración de un mayor número de personal sanitario, consume mucho tiempo y su negatividad debe ser confirmada mediante una provocación abierta. Además ofrece dificultades a la hora de enmascarar muchos alimentos, añadiéndose el inconveniente de la liofilización de los mismos. Las indicaciones de cada provocación están recogidas en el reciente artículo de opinión de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (EAACI)¹¹⁰ (Tabla 9).

Tabla 9. Indicaciones de los distintos tipos de provocación oral con alimentos.

PO doble ciego	PO simple ciego	PO abierta
Es la recomendación general, especialmente si se espera que el resultado de la provocación sea positivo (historia clínica compatible con reacción mediada por IgE y pruebas cutáneas positivas).	Tiene las mismas dificultades que el doble ciego e introduce más factores subjetivos, por lo que se recomienda utilizar el doble ciego.	Puede ser suficiente en reacciones agudas mediadas por IgE con síntomas objetivos.
Es la recomendación general, especialmente si se espera que el resultado de la provocación sea positivo (historia clínica compatible con reacción mediada por IgE y pruebas cutáneas positivas).		Puede ser la primera aproximación cuando existe una probabilidad alta de que la provocación sea negativa (por ejemplo: clínica de reacción inmediata con pruebas cutáneas negativas)
Es el método de elección para protocolos científicos.		En niños de tres años o menores con reacciones de tipo inmediata, excepto si se desea que la madre no reconozca el alimento que se le administra al niño.
Si las reacciones son tardías o los síntomas son crónicos. (dermatitis atópica, reacciones digestivas aisladas tardías o urticaria crónica)		En pacientes con síndrome de alergia oral, excepto en protocolos de investigación o si existen discrepancias entre la historia clínica y los resultados de las pruebas alérgicas. En estas dos últimas excepciones se recomienda la prueba en doble ciego.
En los casos de síntomas subjetivos inducidos por alimentos (síndrome de fatiga crónica, artralgias, migraña etc.)		
Se debe realizar tras una provocación doble ciego negativa para obtener un diagnóstico definitivo (117-119).		

2.2.7.2 Diagnóstico de la APLV.

a. Historia Clínica

La historia clínica ocupa el primer y fundamental escalón en el algoritmo diagnóstico de esta patología. La clínica más frecuente con la que se manifiesta la alergia a la leche es cutánea, y aparece de forma inmediata, en la mayoría de los casos en la primera hora tras su ingesta, lo cual facilita la identificación de la leche como responsable.

b. Detección de IgE específica.

Estudio in vivo: Pruebas cutáneas con alérgenos de la leche.

Las pruebas cutáneas (PC) se realizan tanto en el diagnóstico inicial de la alergia a la leche

como en su seguimiento. Hasta la adecuada estandarización de los extractos de leche comercializados para la realización de pruebas cutáneas, se realizó de rutina la técnica de prick-prick con leche. En la actualidad se utilizan en la práctica clínica habitual extractos comerciales de leche con buenos resultados.

Estudio *in vitro*: detección de IgE específica frente a alérgenos de la leche.

Determinación de IgE específica sérica.

La determinación de anticuerpos IgE específicos se realiza de forma rutinaria antes de la realización de una PO. También en el seguimiento de pacientes alérgicos de larga evolución o que han presentado reacciones graves (anafilaxia). En estos casos aunque no vaya a realizarse una PO de forma inmediata, la determinación de IgE específica, en un intento de aproximarnos al pronóstico de la enfermedad. Existen en la actualidad reactivos comercializados para la determinación de anticuerpos IgE específicos frente a la leche, ALA, BLG Y CAS.

c. Prueba de provocación controlada con leche.

Provocación oral con leche

La PO será innecesaria para confirmar el diagnóstico de alergia a la leche en el caso de una historia clínica compatible con una reacción alérgica mediada por IgE acompañada de una demostración del mecanismo IgE mediante una prueba cutánea positiva o una determinación de IgE positiva frente a alguno de los alérgenos de la leche.

La PO está indicada en el caso de historias clínicas no sugestivas de alergia IgE, cuando las pruebas cutáneas y los anticuerpos IgE específicos son negativos, en el seguimiento de niños alérgicos para la detección del momento de tolerancia o cuando se ha detectado una sensibilización a un alimento mediante PC o IgE específica positiva y se desconoce la reactividad clínica en ese paciente.

La PO es le último eslabón en la cadena del diagnóstico de la alergia a la leche, pero en la actualidad sigue siendo la única prueba que confirma o descarta con total seguridad la alergia a este alimento.

Procedimiento de la provocación oral con leche.

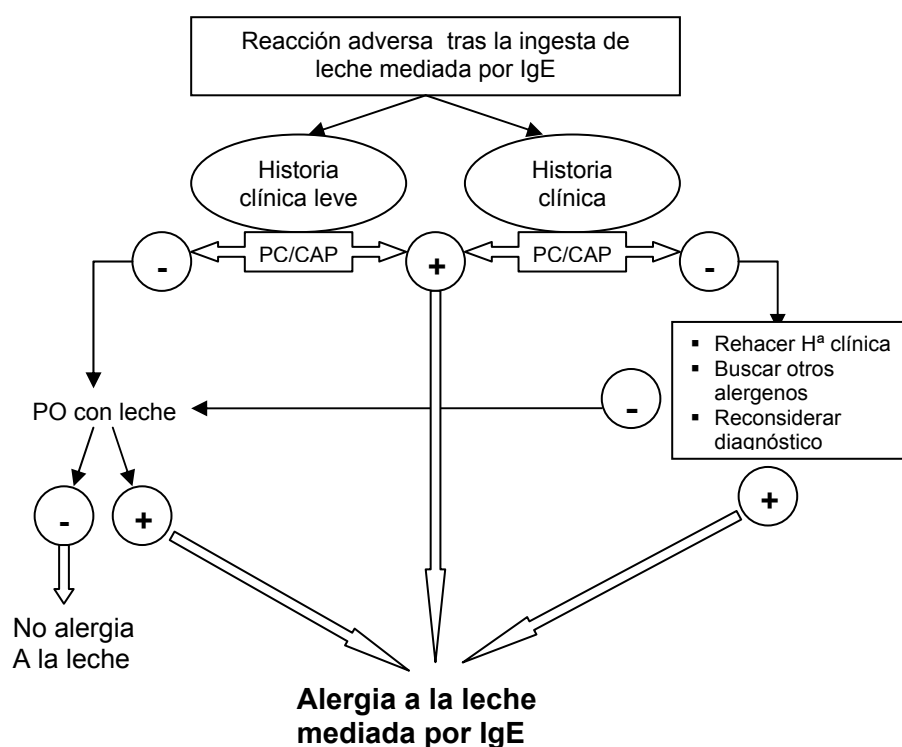
Como se ha comentado en el apartado anterior, el alimento debe administrarse comenzando por una cantidad inferior a la que supuestamente originó la reacción y además se recomienda comenzar por debajo de las “dosis umbral” con la que reaccionan la mayoría de los pacientes,

referida en la literatura¹¹⁵. Los datos de que se disponen indican que un 1 % con 0,1 mg de leche, huevo y cacahuete.

d. Algoritmo diagnóstico en alergia a la leche

Algoritmo de pruebas diagnósticas en el diagnóstico inicial.

Se expone a continuación el algoritmo diagnóstico utilizado en la práctica clínica habitual en la alergia a la leche (Figura 11). El primer escalón en el camino hacia el diagnóstico en la alergia a alimentos es la historia clínica. Tras la detallada anamnesis, se realizan las pruebas cutáneas y la determinación de IgE específica. Con una historia clínica compatible con una reacción alérgica reciente mediada por IgE y una prueba cutánea positiva (≥ 3 mm con respecto al salino) o un nivel de IgE específica $\geq 0,35$ KU/l (nivel de detección de la técnica) frente a alguno de los alérgenos de la leche es suficiente para realizar el diagnóstico de alergia mediada por IgE^{116,117}. Si el resultado de las pruebas es negativo el siguiente paso es la realización de una provocación oral con leche. La provocación oral es una prueba compleja, que consume muchos recursos humanos y económicos, además de una importante inversión de tiempo, no estando exenta de riesgos. Si la provocación es positiva, el paciente es diagnosticado de alergia, debiéndose descartar otros mecanismos aparte del IgE. Si el resultado de la PO es negativo se descarta la patología alérgica.

Figura 11. Algoritmo diagnóstico en la alergia a la leche mediada por IgE.**Algoritmo de pruebas diagnósticas en el seguimiento.**

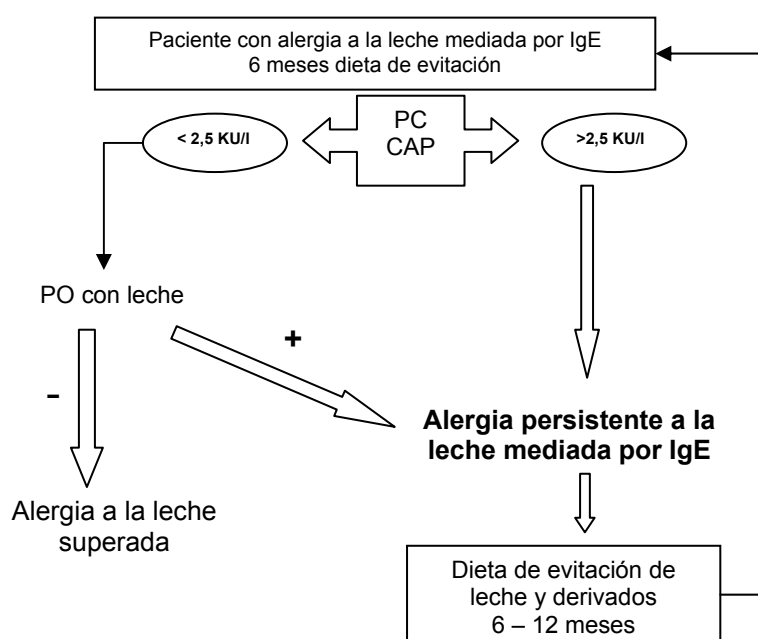
Cuando un niño es diagnosticado de alergia a la leche, en cualquiera de los pasos anteriores, se indica la realización de una dieta de evitación de leche y derivados, y es revisado a los 6 o 12 meses (dependiendo de la edad del niño y la evolución de su patología) (Figura 16). En dicha revisión, se realiza una anamnesis detallada, insistiendo en posibles transgresiones a pesar de la dieta de evitación, que puedan orientarnos acerca de la reactividad clínica del niño con la ingesta del alimento. Será importante recoger el tiempo desde la transgresión, cantidad de leche ingerida, forma de preparación, y la clínica. Tras la detallada anamnesis, se realizan las pruebas cutáneas y la determinación de IgE específica. Así como en el momento del diagnóstico los 3mm de PC y el valor 0,35 KU/l están muy establecidos como criterio de positividad, en la evolución posterior se manejan diferentes puntos de corte de los valores de IgE para predecir un resultado negativo en la provocación oral y por tanto la tolerancia del alimento¹¹⁸⁻¹²¹. En nuestro medio, en la práctica clínica habitual se emplea un punto de corte de 2,5 KU/l para la IgE específica de leche¹¹⁹. En niños más mayores estos valores se modifican al alza¹²². Otros autores encuentran puntos de corte más altos, probablemente debido a la inclusión de pacientes de mayor edad y con mayor porcentaje de dermatitis atópica^{106,118,120,121}. Para confirmar dicha tolerancia siempre es necesaria la realización de la provocación oral. En el caso de que el paciente complete la PO sin ninguna reacción es diagnóstico de haber

alcanzado la tolerancia habiendo superado la alergia a la leche, por lo que desde ese momento realizará dieta libre. Si el resultado de la PO es positivo el paciente continuará con la dieta sin leche hasta la próxima revisión.

Como en el caso de todas las pruebas diagnósticas, la prueba cutánea y el CAP no predicen en el 100% de los casos qué paciente es alérgico y cuál es tolerante. Ambas pruebas comenten errores diagnosticando como alérgicos a niños tolerantes, y como tolerantes a niños alérgicos (falsos positivos y falsos negativos).

La única prueba que nos clasifica con total exactitud a los pacientes en alérgicos o sanos, en el momento actual es la provocación oral. De hecho la provocación oral doble ciego controlada con placebo se considera el patrón oro en los estudios de diagnóstico en alergia a alimentos. Dicha prueba consiste en la administración de dosis progresivas del alimento sospechoso, con el fin de confirmar si se reproduce la reacción tras la toma del alimento. Implica unos costes (económicos, de empleo de tiempo), y no está exenta de riesgos para el niño.

Figura 12. Algoritmo de seguimiento de la alergia a la leche mediada por IgE.



2.2.9.3 Aplicación de la tecnología microarray al diagnóstico de APLV.

Los 'microarray' o micro-matrices en castellano, son dispositivos de análisis que poseen cuatro características: (a) son sustratos planos, en los que (b) dianas microscópicas (spots) son inmovilizadas (c) formando filas y columnas y (d) existe además una unión específica entre estas dianas inmovilizadas en el sustrato plano y las moléculas en solución.

Desde su introducción en 1995¹²³, los 'microarrays' se han expandido rápidamente en todas las

áreas principales de la investigación en bio-médica, incluyendo la expresión génica, las señales de transducción, la inflamación, el cáncer, el ciclo celular, la replicación del DNA, el estrés oxidativo, los ciclos hormonales, las enfermedades neuro-degenerativas, las infecciones, el citoesqueleto y el tráfico de proteínas. Los ensayos iniciales utilizaban el DNA como elemento diana o 'spots', en parte por la facilidad con que se aíslan, marcan, amplifican y almacenan los ácidos nucleicos, pero también por la gran información disponible sobre la expresión génica al nivel del mRNA. Este tipo de ensayos han permitido cuantificar la expresión génica para cada uno de los genes incluidos en la matriz y dado que el nivel de expresión está relacionado con su función, se pueden extraer conclusiones sobre la biología de la célula estudiada¹²⁴.

Es a partir de la secuenciación del genoma humano cuando cobran máxima importancia este tipo de ensayos. Con la conclusión de la secuencia, de la que se dispone de un borrador en 2001 y se completa a finales de 2004¹²⁵, es necesario caracterizar funcionalmente 20000-25000 genes que codifican proteínas. La información generada no es abordable con las técnicas analíticas disponibles hasta el momento. En el campo de la genómica se han empleado los microarrays en el conocimiento de las bases moleculares de la fisiopatología de las enfermedades, la identificación de nuevos genes marcadores (de diagnóstico, pronóstico, monitorización de la evolución o de la respuesta terapéutica) y el desarrollo de fármacos.

El éxito del empleo de la tecnología microarray en el campo de la genómica da lugar a su expansión y adaptación al estudio de proteínas, reacciones enzimáticas o inmunológicas.

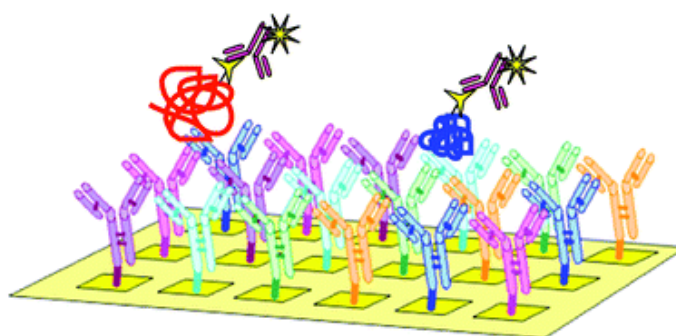
Las respuestas inmunológicas son un fenómeno complejo que sobrepasa el nivel genómico, es decir, dependen en último lugar de la expresión de determinados genes en las células implicadas, pero explicar su función únicamente en términos de expresión génica constituye una aproximación demasiado simplista. Si bien es cierto que estudio de la expresión génica es un aspecto trascendental, la respuesta inmunológica, desde el procesamiento del antígeno al reconocimiento de epítopos específicos ha de ser abordada integralmente para su mejor conocimiento. Se trata de identificar el papel que juegan dianas químicas/biológicas involucradas en las respuestas inmunes desencadenadas por antígenos presentados al sistema inmune. El mejor conocimiento del sistema inmunológico una mejora en el diagnóstico/pronóstico de las enfermedades y el diseño de vacunas.

Los conceptos fundamentales de este tipo de ensayos son los mismos que los microarrays de DNA (preparación de la muestra, reacción bioquímica, detección de la señal y análisis de los datos). Se puede transferir la misma tecnología empleada para el procesamiento de los microarrays de DNA teniendo en cuenta las características estructurales diferenciales de las dianas, es decir los ácidos nucleicos son polímeros lineales y su función depende de la información contenida en esa secuencia lineal. En contraposición las proteínas tienen estructura terciaria y cuaternaria que son fundamentales en su función.

Para abordar el estudio de la respuesta inmunológica se han desarrollado diferentes tipos de ensayos: Microarrays de anticuerpos, microarrays de péptidos y microarrays de péptidos-CMH¹²⁶.

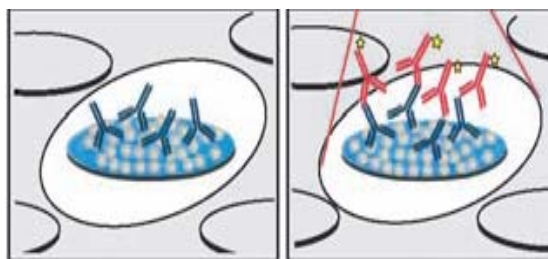
- **Microarrays de anticuerpos.** Se utilizan para medir concentraciones de antígeno para los cuales se dispone de anticuerpos específicos^{127,128}, como por ejemplo medir el perfil antigénico de tumores (como moléculas de superficie celular)^{129,130}. El motivo para medir directamente la concentración de proteínas es la pobre relación existente entre las concentraciones de mRNA y la correspondiente proteína lo cual refleja cambios post-translacionales. La limitación que tienen este tipo de ensayo es que se necesita un anticuerpo para cada molécula específica que se quiere medir (Figura 13).

Figura 13. Microarrays de anticuerpos.



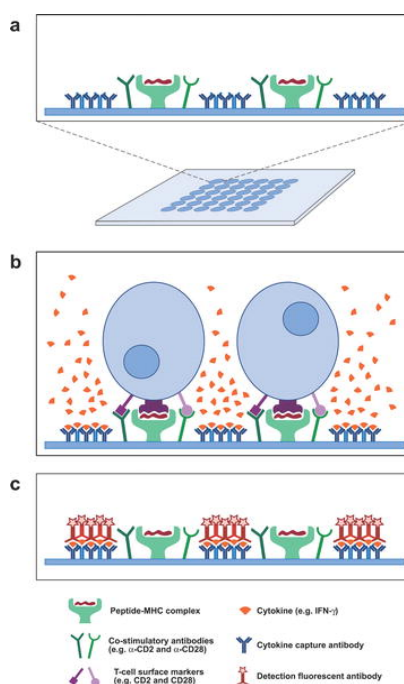
- **Microarrays de péptidos.** Emplean el abordaje opuesto al modelo anterior. Se fijan en los 'spot' proteínas/péptidos antigénicos y se incuban con suero del paciente (midiendo anticuerpos específicos presentes en el suero). Se trata del mismo planteamiento que un ensayo ELISA y permiten estudiar la respuesta humoral de células B. Se han publicado estudios aplicando estos ensayos al abordaje de las enfermedades autoinmunes¹³¹⁻¹³⁴, desarrollo de vacunas¹³⁵, la respuesta a infecciones^{136,137} y las enfermedades alérgicas.^{94,138-142} En el estudio de las respuestas alérgicas IgE mediadas, estos ensayos tienen una aplicación diagnóstica directa, describiendo patrones de reconocimiento inmunológico (distinción entre distintos grupos de pacientes) e indirecta, mejorando el rendimiento de las pruebas diagnósticas ya disponibles en la actualidad (conociendo epítomos se podrían fabricar extractos que mejorasen el rendimiento de estas pruebas). Una aplicación terapéutica potencial sería en el desarrollo de IT específicamente dirigida a esas regiones inmuno-dominantes (Figura 14).

Figura 14. Microarrays de péptidos.



- **Microarrays de péptidos-CMH.** Tienen como objetivo el estudio de epítomos de células T. Se trata de un antígeno unido a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y moléculas co-estimuladoras para facilitar la unión de células T. Se crea de esta forma un sistema presentador de antígenos artificial¹⁴³. Se trata del mismo planteamiento de los ELISPOT. Hay pocos estudios publicados con esta tecnología (Figura 15).

Figura 15. Microarrays de péptidos-CMH.



En el caso de la alergia a alimentos, en concreto a proteínas de leche de vaca, en los estudios de cartografía de los epítomos de las cuatro caseínas a los que se une la IgE específica de los pacientes alérgicos, se han identificado un número de epítomos secuenciales denominados epítomos informativos que son reconocidos por la IgE de los niños que van a permanecer como alérgicos a lo largo del tiempo, hecho que no ocurre en los que desarrollan tolerancia de forma

temprana¹⁴⁴⁻¹⁴⁶, es decir, se ha podido establecer un paralelismo entre el reconocimiento de determinadas zonas en la secuencia lineal de la proteína y patrones clínicos de peor pronóstico, pacientes con alergia persistente.

Los datos referentes a la importancia de estos epítomos lineales han sido generados mediante ensayos con membranas SPOT (Genosys Biotechnologies, Woodlands, Tex, USA). Pero la caracterización del perfil antigénico de pacientes individuales por este método tiene importantes desventajas. La síntesis de un gran número de péptidos es costosa en términos de tiempo, dinero y cantidad de suero necesaria para el ensayo, sin olvidar que se pueden testar un número limitado de pacientes.

Se han empleado ensayos microarray de péptidos para el estudio de otros alérgenos alimentarios con resultados prometedores^{139,147,148}. Shreffler ha desarrollado un ensayo microarray de péptidos para analizar muestras de suero de pacientes alérgicos a cacahuete y confirmó que las áreas antigénicas/alérgicas encontradas se correlacionaban con aquellas definidas mediante en muestreo con membranas SPOT^{141,142}. Se demostró que ensayo microarray de péptidos propuesto es mas sensible dado que se definieron nuevas áreas que no habían sido descritas previamente. Además asoció el reconocimiento de determinadas regiones con manifestaciones clínicas más severas. El éxito del empleo de esta etnología microarray en el estudio de alérgenos alimentarios ha motivado el estudio de alérgenos de la leche y establecer la importancia del reconocimiento de determinados epítomos en la alergia a proteínas de leche de vaca.

2.2.8 Tratamiento de la alergia a alimentos.

a. Evitación

Tras establecer el diagnóstico de la alergia alimentaria, la única terapia eficaz al 100% en la actualidad es la estricta eliminación de la dieta del alimento responsable. Esta dieta deberá mantenerse temporalmente, en el caso de aquellas alergias alimentarias transitorias (típicamente leche y huevo en la edad infantil), o durante el resto de la vida del paciente, en el caso de alergias alimentarias no transitorias, generalmente aquellas instauradas en la edad adulta (frutos secos, frutas, mariscos).

En una dieta de exclusión deben prohibirse todos los alimentos implicados así como sus derivados. Esta situación se complica en el caso de alimentos muy ubicuos, como la leche y el huevo, ampliamente utilizados en la preparación de alimentos tanto a nivel familiar como en restauración y a nivel industrial. Dicha ubicuidad hace que las familias de los pacientes se enfrenten a numerosos problemas en su vida diaria, como buscar alimentos alternativos, mirar el etiquetado de todos los productos manufacturados, miedo a que coman fuera de casa, etcétera. Estos problemas se intensifican a medida que la edad del niño alérgico avanza, debido a la escolarización y la progresiva socialización, que con frecuencia incluye comidas fuera del domicilio familiar (comedor escolar, cumpleaños, excursiones,...).

Por otra parte, son cada vez más los niños que presentan alergia a diversos alimentos (típicamente leche y huevo), limitándose mucho las opciones dietéticas de estos niños, con el riesgo de no conseguir una dieta suficientemente diversificada y con un valor nutricional adecuado.

En un estudio realizado recientemente en Québec, se ha constatado que el entorno del niño alérgico se ha vuelto más seguro en los últimos años, reduciéndose el número de ingestiones accidentales de cacahuete en niños con alergia a este alimento, a pesar de lo cual un 15% de los niños por año de seguimiento presentaron exposiciones accidentales, de las cuales un 57% fueron moderadas-severas¹⁴⁹.

El tratamiento en caso de reacción comprende el uso de antihistamínicos y corticoides tanto orales como parenterales, así como de adrenalina. Los pacientes que hayan sufrido reacciones graves deben ser instruidos para identificar precozmente los síntomas de anafilaxia y acerca de cómo utilizar la adrenalina autoinyectable¹⁵⁰.

Al igual que pasa con el resto de alimentos, no existe actualmente un tratamiento activo de la alergia a la leche (ni a ningún otro alimento). Los pacientes alérgicos deben evitar de forma estricta la leche y todos los productos lácteos derivados. Como alternativas, en la primera infancia pueden utilizar fórmulas extensamente hidrolizadas de caseína y/o proteínas séricas, y a partir de los 2 años fórmulas de soja¹⁵¹. Estas fórmulas alternativas son aceptables en el primer año de vida, y mientras el niño permanezca en un entorno familiar seguro. Una vez que el niño alérgico a la leche de vaca comienza a acudir a la guardería, o es escolarizado, comienza a tener más riesgo de exponerse a la leche, y tanto sus familiares como cuidadores/educadores deben ser informados de su alergia para evitar trasgresiones dietéticas accidentales que pueden inducir reacciones alérgicas, de variable e impredecible intensidad, pero potencialmente graves. Con la diversificación de la dieta y la socialización, el riesgo de reacciones accidentales aumenta, y se debe vigilar la composición de todos los alimentos, lo que es una fuente de estrés y altera notablemente la calidad de vida del paciente y de todo su entorno familiar¹⁵².

b. Tratamiento farmacológico

Se ha estudiado el tratamiento con antihistamínicos en la alergia a alimentos, fuera de una reacción aguda tras ingesta accidental¹⁵³. En general, no se recomienda esta indicación de los antihistamínicos por el riesgo que existe de enmascaramiento de manifestaciones sistémicas potencialmente graves, cuyo desarrollo no sería evitado por estos fármacos. También se han realizado estudios con cromoglicato sódico^{154,155}.

Ningún tratamiento sintomático administrado de forma mantenida se ha convertido en una

opción terapéutica para esta patología, dado que aún en el supuesto de que consiguiera evitar por completo la reacción con la ingesta del alimento, obligaría, en el caso de alimentos de ingesta habitual, como la leche y el huevo, a la toma diaria durante años del fármaco, o incluso durante toda la vida.

d. Desensibilización e inmunoterapia.

Durante muchos años la actitud clínica frente a la alergia a los alimentos en general, y a la leche en particular, ha sido “pasiva”: el alergólogo esperaba al desarrollo de tolerancia natural en los casos favorables y en aquellos que no la desarrollaban se conformaba con indicar una dieta de evitación y un tratamiento de rescate confiando en que su paciente – con suerte – no presentara ninguna reacción, o en el peor de los casos, que no fuera grave. Sin embargo, en los últimos años algunos grupos han comenzado a adoptar una actitud activa en la alergia a los alimentos y han iniciado protocolos de desensibilización o inducción oral de tolerancia (IOT) y de inmunoterapia (IT) específica con alimentos, para intentar “curar” a estos pacientes de riesgo con alergias persistentes, potencialmente graves y con riesgo de encontrarse el alimento problema como un ingrediente oculto. Hasta el momento se han realizado un número muy limitado de ensayos clínicos de IT en alergia a cacahuete, avellana y melocotón, y se han desarrollado protocolos de IOT en leche y huevo^{2,156-160}.

La IOT consiste en administrar dosis crecientes del alimento por vía oral, bajo supervisión médica, hasta alcanzar la tolerancia, es decir conseguir que el paciente tome el alimento en cantidades adecuadas sin presentar reacción. En los estudios hasta ahora publicados se ha conseguido alcanzar la tolerancia entre 70-90% de los casos¹⁶¹⁻¹⁶⁴, y en aquellos que no consiguen llegar a tolerar una ración normal del alimento, al menos se aumenta su nivel umbral de respuesta con lo que se consigue protegerlos de las reacciones inducidas por pequeñas cantidades de alérgeno encontradas como trazas, o ingredientes ocultos en otros alimentos preparados¹⁶⁵. No se conoce por el momento cual es la evolución a largo plazo de los pacientes en los que se ha inducido tolerancia oral (desensibilizados), ni se han estudiado en profundidad los mecanismos inmunológicos subyacentes¹⁶⁶⁻¹⁷¹.

2.2.9 Pronóstico e historia natural de la APLV.

En la primera infancia, la alergia a leche tiende a evolucionar a la remisión a corto o medio plazo. Al año de vida, se ha establecido la tolerancia en el 50-60% de los niños, a los dos años en el 70-75%, y a los 4 años en el 85%^{40,41,172}. A partir de ese momento, alcanzar la tolerancia es menos probable, aunque hay estudios que refieren que es posible una evolución hacia la tolerancia por encima de los 4 años de edad en un mayor porcentaje del descrito en estudios previos¹⁷². La evolución en la edad adulta es desconocida. La gravedad de la sintomatología inicial no tiene valor pronóstico respecto a la evolución a la tolerancia ni el tiempo en que esta

se instaure. Se han identificado como factores de mal pronóstico la persistencia de alergia a la leche a partir de los 4 años, y la persistencia de IgE sérica elevada frente a caseína^{41,172-175}.



Capítulo 3

OBJETIVOS

OBJETIVO CONCEPTUAL:

En una población de pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca que presentan unos niveles de IgE específica que indican la realización de una provocación oral, identificar aquellos pacientes que van a presentar una provocación positiva.

Objetivos específicos:

- Valor predictivo de ese valor de la IgE específica en determinar la tolerancia.
- Evaluación de las pruebas cutáneas en el diagnóstico de la persistencia de alergia a leche de vaca.
- Determinación de la diversidad clonal de los anticuerpos de las clases IgE e IgG4 para el reconocimiento de epítomos lineales de los alergenios mayores alimentarios alfa s1-caseína, alfa s2-caseína, beta-caseína, kappa-caseína y betalactoglobulina de la leche de vaca, en una población de pacientes diagnosticados de alergia a proteínas de leche de vaca en seguimiento.
- Identificar patrones de reconocimiento mediante microarrays asociados a reactividad clínica.



Capítulo 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio Transversal de evaluación de pruebas diagnósticas. Para los objetivos de evaluación de la IgE específica frente a leche de vaca y de evaluación de las pruebas cutáneas en el diagnóstico de la persistencia de alergia a leche de vaca se realizó un estudio transversal prospectivo de evaluación de pruebas diagnósticas. A todos los pacientes incluidos en el estudio (ver más adelante criterios de inclusión y exclusión) se realizaron las pruebas planteadas (IgE y PC) y se realizó de forma programada la provocación oral (PO) siguiendo la práctica clínica habitual. La interpretación del resultado tanto de las pruebas diagnósticas como del patrón oro se realizará sin conocer el resultado del resto de pruebas. Para el objetivo de determinación de epítomos lineales mediante microarrays de péptidos se seleccionó otro grupo de pacientes de características similares en los que se realizó la PO (pacientes tolerantes y pacientes reactivos).

4.2 POBLACIÓN ESTUDIADA

El Hospital Ramón y Cajal es el hospital de referencia del Área Sanitaria 4 de la Comunidad de Madrid. Da servicio a los distritos de Ciudad Lineal, Hortaleza, Barajas y San Blas, atendiendo a una población de 510.000 habitantes (Memoria Anual Hospital Ramón y Cajal, año 2006).

De los pacientes que acuden a la consulta de Alergia Infantil del Servicio de Alergia del Hospital Ramón y Cajal, se seleccionaron de forma prospectiva niños diagnosticados de alergia proteínas de leche de vaca.

Criterios de inclusión

Se seleccionó de forma prospectiva, desde Enero del 2003 a Enero de 2005, una serie consecutiva de niños, entre 0 y 14 años, pertenecientes al área sanitaria 4 de la Comunidad de Madrid, que cumplieran las dos características siguientes:

- ☐ Estar diagnosticados de alergia a las proteínas de leche de vaca. Se consideró *diagnóstico de alergia proteínas de leche de vaca* presentar una reacción adversa tras la ingesta de leche clínicamente compatible con alergia mediada por IgE, junto con presencia de prueba cutánea positiva frente a leche (≥ 3 mm) y fracciones o presencia de anticuerpos IgE específicos frente a las proteínas de leche de vaca ($\geq 0,35$ KU/l).
- ☐ Haber cumplido un tiempo de evitación estricta de leche y derivados durante al menos seis meses.

Se consideró una *reacción adversa clínicamente compatible con alergia mediada por IgE frente a un alimento* aquella que cumplía los siguientes criterios:

- síntomas cutáneos (prurito, urticaria aguda, angioedema), digestivos (dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea), respiratorios (rinorrea, congestión nasal, estornudos, tos, disnea,

sibilancias) o cardiovasculares (taquicardia, hipotensión), después de la ingestión del alimento.

- tiempo de intervalo desde la ingesta hasta la aparición de los síntomas no mayor de dos horas.

Se consideró una *evitación estricta de leche* al cumplimiento de las normas de evitación realizadas tanto de forma oral como por escrito a los padres de los niños en la consulta (**Anexo 2**). Por anamnesis exhaustiva se garantizó que el paciente no había tenido contacto con leche sintomático ni asintomático.

Criterios de exclusión.

Se excluyeron del estudio aquellos niños que cumplieran alguno de los siguientes criterios:

- Historia de anafilaxia tras la ingesta de leche (aquellos pacientes con antecedente de reacción clínica grado 2 con compromiso respiratorio o grado 3 de la clasificación para reacciones sistémicas de hipersensibilidad de Brown¹⁷⁶. Mediante este criterio quedaron excluidos aquellos pacientes que habían presentado hipotensión arterial, hipoxia, compromiso neurológico o respiratorio.
- Enfermedad grave concomitante.
- Contraindicación para la administración de adrenalina.

4.3 PROTOCOLO DEL ESTUDIO

En una primera fase se reclutaron todos los pacientes que acudieron a la Consulta de Alergia Infantil del Servicio de Alergia del Hospital Ramón y Cajal, desde Enero del 2003 a Enero de 2005 y cumplieron los criterios de inclusión detallados anteriormente fueron incluidos en el estudio.

A todos los pacientes incluidos se les realizó en el momento de su revisión en la Consulta de Alergia Infantil una historia clínica exhaustiva.

Se obtuvo sangre de todos los pacientes (extracción sanguínea realizada a continuación de la historia clínica). Dichas muestras se procesaron para la obtención de suero, que se congeló en alícuotas para su conservación hasta su utilización para la determinación de IgE total y específica frente a los alérgenos de la leche de forma simultánea al finalizar el reclutamiento de pacientes y para la posterior determinación de epítomos lineales mediante microarray de péptidos. Tras la extracción sanguínea, a todos los pacientes se les realizaron pruebas cutáneas con los alérgenos de la leche, según metodología que se detalla a continuación.

En aquellos pacientes que presentaron una determinación de IgE específica frente a leche por debajo de 2.5 KU/l, siguiendo las recomendaciones de estudios previos¹¹⁶, se programó una provocación oral. El especialista que valoraba el resultado de la provocación desconocía la

inclusión del paciente en el estudio y el valor de las pruebas cutáneas. Dicho alergólogo desconocía también el resultado de la determinación de anticuerpos IgE. La provocación oral con el huevo se realizó según metodología recomendada por la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica EAACI como se detalla a continuación.

En función del resultado de la provocación oral, los pacientes fueron clasificados de la siguiente manera:

- 1 Provocación oral positiva: niños con *alergia persistente a la leche*, pacientes que presentaron en las 2 primeras horas tras la ingesta de huevo síntomas cutáneos (urticaria, angioedema), síntomas digestivos o síntomas respiratorios durante la provocación oral con el huevo.
- 2 Provocación oral negativa: niños *tolerantes*, pacientes que no presentaron ninguna reacción durante la provocación con leche.

Todos los pacientes que toleraron la leche fueron revisados un mes después de la provocación oral, con el objetivo de confirmar la buena tolerancia a la leche una vez incorporada en todas sus formas de preparación en la dieta habitual del niño.

Se obtuvo el Consentimiento Informado por parte de los padres de todos los niños incluidos en el estudio (**Anexo 3**).

Se obtuvo la aprobación por parte del Comité Ético del Hospital Ramón y Cajal en el que se desarrolló el estudio (**Anexo 4**).

En una segunda fase entre Enero 2005 a Febrero de 2006 se reclutaron pacientes que cumpliendo los criterios referidos anteriormente se les realizó una provocación oral con leche para el objetivo de realizar el estudio mediante microarrays de péptidos. .

4.3.1 Historia clínica

El médico de la Consulta de Alergia Infantil, recogió en la historia clínica los siguientes datos:

a) acerca del paciente:

- sexo.
- fecha de nacimiento, fecha de inclusión en el estudio.
- edad de comienzo de los síntomas con la ingesta de leche.
- antecedentes de patologías alérgicas y otras relacionadas: dermatitis atópica, rinoconjuntivitis y/o asma extrínsecos, asma bronquial no alérgico (177), lactancia materna exclusiva y durante cuánto tiempo.

b) acerca del alimento implicado:

- forma de introducción de la fórmula de continuación, cuantos días tomó la fórmula de continuación o si fue con el primer biberón. Cantidad de leche con la que se produjo la reacción.

c) acerca del cuadro clínico:

- síntomas atribuidos al alimento: síntomas mucocutáneos, incluyendo rash pruriginoso morbiliforme, urticaria y/o angioedema; síntomas digestivos, como vómitos, náuseas, diarrea y/o dolor abdominal; síntomas respiratorios, que afecten a vías altas (hidrorrea, estornudos, conjuntivitis y/o congestión nasal) o vías respiratorias bajas (disnea, tos, sibilancias); síntomas cardiovasculares, taquicardia e hipotensión.
- tiempo transcurrido desde el último episodio en meses.

Esta información se recogió mediante la Hoja de Recogida de Datos (Anexo 4) y posteriormente se introdujo en una base de datos Spss.

4.3.2 Pruebas cutáneas.*Extractos para pruebas cutáneas.*

Para evitar la variabilidad en cuanto a potencia de los extractos se utilizaron extractos comerciales del mismo lote de los Laboratorios ALK-Abelló de leche, alfa lactoalbúmina, betalactoglobulina y caseína.

Metodología de las pruebas cutáneas.

Las pruebas cutáneas se realizaron siempre por el mismo personal entrenado en la técnica y en el manejo de reacciones sistémicas graves. Siempre se llevaron a cabo en el Laboratorio de Alergia del Hospital Ramón y Cajal, en el que se dispone del material y la medicación necesarios para el tratamiento de una reacción sistémica, y realizar una reanimación en el caso de que fuera preciso (adrenalina, beta-adrenérgicos, vasoconstrictores, teofilinas, antihistamínicos, oxígeno, y sistema de fluidoterapia). Las pruebas fueron realizadas en todos los casos por personal de enfermería entrenado en la realización de esta técnica, y la valoración del resultado fue llevada a cabo por el médico responsable del Laboratorio, distinto especialista del que valoraba la prueba de provocación.

Antes de su realización se tenían en cuenta los siguientes aspectos:

- que el paciente no presentara en ese momento síntomas alérgicos agudos, fundamentalmente asma bronquial.
- que el paciente no estuviera en tratamiento con fármacos que pudieran enmascarar el resultado de las pruebas: fármacos con efecto antihistamínico (antihistamínicos, antidepresivos,...) fármacos beta-adrenérgicos (vía sistémica), ni corticoides tópicos.

- se evaluaban las condiciones de la piel sobre la que se iban a realizar las pruebas para evitar posibles errores en la interpretación del resultado (por ejemplo, la presencia de una placa de dermatitis atópica en la zona).
- se revisaban los extractos para confirmar que estaban en condiciones adecuadas (fecha de caducidad, conservación en frío).

Se realizaron pruebas cutáneas mediante la técnica de prick (lancetas estériles Icogamma Novico SPA, Ascoli Piceno, Italia, Código 855100), siguiendo las normas aceptadas internacionalmente¹⁰⁰, con extractos de leche, alfa lactoalbúmina, betalactoglobulina y caseína de los Laboratorios ALK-Abelló. Como control positivo se utilizó histamina a una concentración de 10 mg/ml y como control negativo solución salina.

Se identificó la zona de aplicación de cada uno de los alérgenos haciendo una marca con un rotulador en la piel del antebrazo, entre la fosa antecubital y la muñeca, respetando una distancia mínima entre cada marca de 2 o 3 cm. Se aplicó una gota de cada uno de los alérgenos a testar en cada una de las marcas, y se puncionó con una lanceta, en dirección perpendicular a la piel, atravesándola. Se utilizó una lanceta distinta para cada extracto. Por último se secó el sobrenadante de extracto con papel secante sin friccionar. La lectura se efectuó a los 10-15 minutos, midiéndose el diámetro mayor y el ortogonal obtenido en su punto medio, en milímetros. Se realizaron por duplicado, en los dos antebrazos del paciente. La media de estas dos medidas fue el valor utilizado para el análisis estadístico (variable cuantitativa, en milímetros).

Esta información se recogió mediante la Hoja de Recogida de Datos (**Anexo 5**) y posteriormente se introdujo en una base de datos SPSS.

4.3.3 Determinación de IgE.

Se obtuvo sangre para la determinación de niveles séricos de IgE total y de anticuerpos IgE específicos frente a leche, alfa lactoalbúmina, betalactoglobulina y caseína, mediante CAP System Pharmacia FEIA (Phadia, Uppsala, Sweden). Dicha determinación se llevó a cabo en la Sección de Inmunoalergia del Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal.

El CAP System FEIA [Phadia; Uppsala, Sweden] es un sistema automatizado, de fluoroenzimainmunoanálisis e incluye reactivos y el correspondiente software. El sistema consta de un carrier, el inmuno-CAP, un soporte de un derivado de la celulosa al que se une covalentemente, tras la activación con bromuro de cianógeno, el alérgeno de interés.

Determinación de IgE total.

Para la detección de IgE total se une al CAP System una anti-IgE monoclonal, en lugar del alérgeno. Para calcular los resultados, se construye una curva de referencia, en un papel semilogarítmico, colocando la media de fluorescencia de cada estándar frente a la concentración de IgE. Posteriormente la media de fluorescencia de cada suero problema se

lleva a la curva estándar y se lee la concentración de IgE que le corresponde. Los valores se expresan en KU/l.

El sistema comienza haciendo un lavado del CAP System, que contiene el anticuerpo contra IgE. Seguidamente el aparato dispensa cada uno de los sueros problema, los estándares y los controles. Esta fase de reacción antígeno/anticuerpo se incuba durante 30 minutos. La anti-IgE unida covalentemente al InmunoCAP reacciona con la IgE total del suero del paciente. Tras lavar para eliminar la parte que no se une, se añade un anticuerpo anti-IgE marcado con una enzima (beta-galactosidasa). Posteriormente se incuba el complejo anti-IgE problema + IgE + anti-IgE [enzima] durante 30 minutos y se lava el InmunoCAP, retirando la anti-IgE que no se ha unido. Finalmente se lava y se añade una solución de revelado durante 10 minutos. Tras parar la reacción, se añade una sustancia reductora que libera la enzima y reacciona con un sustrato cromógeno para formar un compuesto coloreado. La fluorescencia es medida por un fluorímetro, que sitúa los valores obtenidos en cada suero problema sobre la curva de calibración expresando los resultados en KU/l. El cambio de coloración de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de Ige presente en el suero del paciente. El rango de medida del sistema es de 2 a 5000 KU/l. El método emplea 50 µl de suero.

Determinación de IgE específica.

El sistema comienza haciendo un lavado del CAP System, que contiene el anticuerpo contra IgE. Seguidamente el aparato dispensa cada uno de los sueros problema, los estándares y los controles. El alérgeno de interés unido covalentemente al CAP System reacciona con la IgE específica del suero. Tras lavarlo y retirar la IgE no específica, se añade un anticuerpo anti-IgE (anticuerpo monoclonal de ratón) marcado enzimáticamente (beta-galactosidasa) para formar un inmunocomplejo (alérgeno + IgE problema + anti-IgE [enzima]) sobre en CAP System. Después de la incubación, se lava para eliminar las anti-IgEs marcadas no unidas y se añade una solución de desarrollo (4-metil-umbeliferil beta-D galactosidasa) que forma un compuesto coloreado. Finalmente la reacción fluorescente se interrumpe con una solución stop (carbonato cálcico). La fluorescencia es medida por un fluorímetro, que sitúa los valores obtenidos en cada suero problema sobre la curva de calibración expresando los resultados en KU/l. El cambio de coloración de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de Ige presente en el suero del paciente. El método emplea 50 µl de suero y el tiempo total necesario para la realización de la técnica son 2 horas y media. El sistema permite una gama de medida de IgE de 0,35 a 100 KU/l (181). Tradicionalmente los valores del CAP se clasifican en 6 clases: clase 0 (<0,35 KU/l), clase 1 (0,35-0,69 KU/l), clase 2 (0,7-3,49 KU/l), clase 3 (3,5-17,49 KU/l), clase 4 (17,5-49,9 KU/l), clase 5 (50-99,9 KU/l), clase 6 (≥ 100 KU/l). Se consideran resultados negativos los inferiores a 0,35 KU/l.

Los resultados de las determinaciones de la IgE total y los anticuerpos IgE específicos frente a los antígenos del huevo se recogieron como variables numéricas en KU/l. Esta información se recogió mediante la Hoja de Recogida de Datos (**Anexo 5**) y posteriormente se introdujo en una base de datos SPSS.

4.3.4 Provocación oral controlada

Para la realización de la provocación oral controlada se siguió la metodología habitual recomendada por la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica EAACI*

- En los niños mayores de 3 años se realizó una provocación doble ciego controlada con placebo.
- En los niños menores de 3 años se realizó una provocación abierta.

Todas las provocaciones fueron supervisadas por la misma enfermera, y el mismo alergólogo, de forma ciega, entrenados ambos en la realización de provocaciones con alimentos. En todos los casos se realizaron en el Laboratorio de Alergia del Hospital Ramón y Cajal, en el se dispone de equipos de reanimación para el control y tratamiento de posibles reacciones graves^{150,177,178} (incluido adrenalina y oxígeno), ubicado cerca de una unidad de cuidados intensivos. Los biberones necesarios para la realización de la provocación eran solicitados y preparados diariamente en biberonería del Hospital Ramón y Cajal, utilizando en todos los casos la misma fórmula adaptada (inicio o continuación según la edad del niño).

Antes de realizar una provocación oral se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- El paciente no debía presentar ninguna enfermedad concomitante (infecciones respiratorias, rinitis alérgica, fiebre, etc.) y debía estar asintomático desde el punto de vista alérgico o con la mínima sintomatología posible en los casos de dermatitis atópica. En pacientes asmáticos se realizó en fase estable (ausencia de reagudizaciones en el último mes)
- Se suspendió la medicación que pueda enmascarar, atrasar, aumentar o evitar las reacciones alérgicas o interferir en el tratamiento de las reacciones (antihistamínicos, neurolépticos, esteroides orales (más de 5mg/día), AINES, inhibidores de la ECA, beta-bloqueantes. Si no fuera posible suspender estas medicaciones la provocación se contraindicó, y el paciente se excluyó del estudio.
- Se confirmó que el paciente estaba realizando una dieta de eliminación previa del alimento implicado.

Las pruebas de provocación se llevaron a cabo en el hospital, de forma ambulatoria, comenzando a las 9 de la mañana y con observación de, al menos, dos horas después de la última dosis.

Los pacientes estaban en ayunas al iniciar la provocación cada día. Se realizaron provocaciones, según Protocolo adjunto (**Anexo 6**).

Antes de administrar la siguiente dosis, se interrogaba a los padres acerca de los síntomas que había observado tras la ingesta y se realizaba una exploración física al niño. En el caso de presentar una reacción durante la provocación, se detuvo la prueba de tolerancia, el paciente recibió el tratamiento correspondiente en función de la clínica en cada caso (antihistamínicos,

corticoides, adrenalina, oxigenoterapia, fluidoterapia)^{150,177,178} y se mantuvo en observación el tiempo necesario hasta su completa recuperación. En el caso de reacciones graves, se dejó al paciente en observación hospitalaria durante varias horas.

Aquellos pacientes que completaron la provocación sin presentar ninguna reacción se clasificaron como niños tolerantes o no alérgicos a la leche. Todos estos niños fueron revisados un mes después de la provocación, con el objetivo de confirmar la buena tolerancia a dicho alimento una vez incorporado en todas sus formas de preparación en la dieta habitual del niño.

Aquellos pacientes que presentaron una reacción en cualquiera de los pasos de la provocación, fueron clasificados como alérgicos a la leche o no tolerantes. A estos pacientes se les indicó que continuaran con la dieta estricta de evitación de leche y derivados, según indicaciones dadas en consulta hasta la siguiente revisión.

En aquellos casos en los que el paciente presentaba durante la provocación con leche, síntomas subjetivos o no sugestivos de alergia mediada por IgE (dolor abdominal aislado, cefalea, síntomas respiratorios sugestivos de etiología infecciosa,...) se detenía la prueba y cuando el paciente volvía a estar completamente asintomático se reiniciaba la provocación repitiendo la última dosis con la que había experimentado la “reacción no concluyente”. En los pacientes en los que dicha sintomatología no apareciese de nuevo se completaría el protocolo establecido, y en aquellos en los que apareciese de nuevo esta clínica se detendría la provocación y sería analizados en un subgrupo a parte.

El resultado de la provocación se recogió de la siguiente manera:

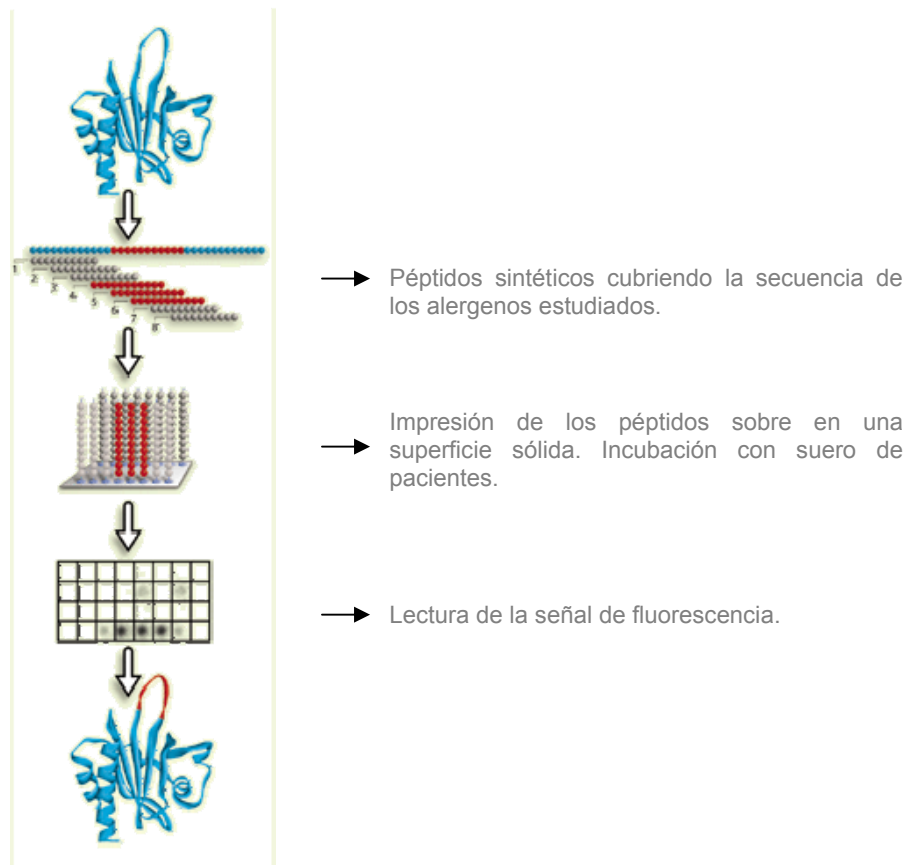
- El resultado final (positivo o negativo).
- La clínica que presentaron los pacientes con una provocación oral positiva: síntomas mucocutáneos, incluyendo rash pruriginoso morbiliforme, urticaria y/o angioedema; síntomas digestivos, como vómitos, náuseas, diarrea y/o dolor abdominal; síntomas respiratorios, que afecten a vías altas (hidrorrea, estornudos, conjuntivitis y/o congestión nasal) o vías respiratorias bajas (disnea, tos, sibilancias); síntomas cardiovasculares, taquicardia e hipotensión.
- El tiempo desde la ingesta del alimento hasta la aparición de la clínica.
- Con qué dosis del protocolo presentó la reacción.

Esta información se recogió mediante la Hoja de Recogida de Datos (Anexo 4) y posteriormente se introdujo en una base de datos Spss.

4.3.5 Determinación de epítomos lineales mediante microarray de péptidos.

Para llevar a cabo el objetivo de la presente tesis doctoral de reconocimiento de epítomos lineales de alérgenos de la leche (caseínas y betalactoglobulina) por anticuerpos de la clase IgE se diseñó un ensayo microarray antígeno-anticuerpo en el péptidos sintéticos con una longitud de 20aa que cubren la secuencia de las proteínas alérgénicas fueron inmovilizados en paralelo una superficie sólida y posteriormente incubados con el suero de los pacientes. Para detectar la unión a epítomos específicos se utilizaron anticuerpos marcados con fluorescencia cuya intensidad fue captada por un escáner digital que da información cruda de la respuesta inmunológica a cada péptido alérgénico en forma de intensidad de fluorescencia. Todos estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Alergia a alimentos del 'Jaffe Food Allergy Institute' de Mount Sinai School of Medicine (New York). A continuación se describe la metodología empleada:

Figura 16. Secuencia del experimento planteado.



Peptidos

Se sintetizaron péptidos derivados de la secuencia lineal de α s1-, α s2-, β - y κ -caseinas, y β -lactoglobulina. Se seleccionaron estas proteínas alergénicas de la leche por haber mostrado información relevante en los estudios previos con membrana SPOT, no se incluyó la α -lactoalbúmina por no haberse encontrado en los estudios previos epítomos lineales importantes asociados con la persistencia de reactividad clínica. Los péptidos fueron sintetizados por JPT Peptide Technologies, (Berlin, Germany) siguiendo la secuencia facilitada y asegurando una pureza de al menos el 70% (**Anexo 7**). Se generaron péptidos con una longitud de 20 aminoácidos con un solapamiento de 17 aminoácidos entre cada péptido y el siguiente (diferencia en 3 aminoácidos, '3-offset') hasta cubrir toda la secuencia. Se recibieron liofilizados en viales individuales etiquetados:

- α s1- caseina: aa 1 al 61.
- α s2- caseina: aa 1 al 64.
- β - caseina: aa 1 al 64.
- κ -caseina: aa 1 al 51.
- β -lactoglobulina: aa 1 al 49.

Cada vial fue resuspendido en buffer de impresión (Protein Printing Buffer, ArrayIt) hasta alcanzar una concentración de 150 μ M conteniendo el 33% de Dimetil-sulfóxido (DMSO). Los péptidos se transfirieron a placas de 96 pocillos siguiendo la siguiente distribución. (Figura 17) y fueron almacenados hasta su posterior uso a -40°C .

Figura 17. Distribución de los péptidos en placas de 96.

Placa 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	α S1-01	α S1-02	α S1-03	α S1-04	α S1-05	α S1-06	α S1-07	α S1-08	α S1-09	α S1-10	α S1-11	α S1-12
B	α S1-13	α S1-14	α S1-15	α S1-16	α S1-17	α S1-18	α S1-19	α S1-20	α S1-21	α S1-22	α S1-23	α S1-24
C	α S1-25	α S1-26	α S1-27	α S1-28	α S1-29	α S1-30	α S1-31	α S1-32	α S1-33	α S1-34	α S1-35	α S1-36
D	α S1-37	α S1-38	α S1-39	α S1-40	α S1-41	α S1-42	α S1-43	α S1-44	α S1-45	α S1-46	α S1-47	α S1-48
E	α S1-49	α S1-50	α S1-51	α S1-52	α S1-53	α S1-54	α S1-55	α S1-56	α S1-57	α S1-58	α S1-59	α S1-60
F	α S1-61	α S2-01	α S2-02	α S2-03	α S2-04	α S2-05	α S2-06	α S2-07	α S2-08	α S2-09	α S2-10	α S2-11
G	α S2-12	α S2-13	α S2-14	α S2-15	α S2-16	α S2-17	α S2-18	α S2-19	α S2-20	α S2-21	α S2-22	α S2-23
H	α S2-24	α S2-25	α S2-26	α S2-27	α S2-28	α S2-29	α S2-30	α S2-31	α S2-32	α S2-33	α S2-34	α S2-35

Placa 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	α S2-36	α S2-37	α S2-38	α S2-39	α S2-40	α S2-41	α S2-42	α S2-43	α S2-44	α S2-45	α S2-46	α S2-47
B	α S2-48	α S2-49	α S2-50	α S2-51	α S2-52	α S2-53	α S2-54	α S2-55	α S2-56	α S2-57	α S2-58	α S2-59
C	α S2-60	α S2-61	α S2-62	α S2-63	α S2-64	β Cas-01	β Cas-02	β Cas-03	β Cas-04	β Cas-05	β Cas-06	β Cas-07
D	β Cas-08	β Cas-09	β Cas-10	β Cas-11	β Cas-12	β Cas-13	β Cas-14	β Cas-15	β Cas-16	β Cas-17	β Cas-18	β Cas-19
E	β Cas-20	β Cas-21	β Cas-22	β Cas-23	β Cas-24	β Cas-25	β Cas-26	β Cas-27	β Cas-28	β Cas-29	β Cas-30	β Cas-31
F	β Cas-32	β Cas-33	β Cas-34	β Cas-35	β Cas-36	β Cas-37	β Cas-38	β Cas-39	β Cas-40	β Cas-41	β Cas-42	β Cas-43
G	β Cas-44	β Cas-45	β Cas-46	β Cas-47	β Cas-48	β Cas-49	β Cas-50	β Cas-51	β Cas-52	β Cas-53	β Cas-54	β Cas-55
H	β Cas-56	β Cas-57	β Cas-58	β Cas-59	β Cas-60	β Cas-61	β Cas-62	β Cas-63	β Cas-64	κ Cas-01	κ Cas-02	κ Cas-03

Placa 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	κ Cas-04	κ Cas-05	κ Cas-06	κ Cas-07	κ Cas-08	κ Cas-09	κ Cas-10	κ Cas-11	κ Cas-12	κ Cas-13	κ Cas-14	κ Cas-15
B	κ Cas-16	κ Cas-17	κ Cas-18	κ Cas-19	κ Cas-20	κ Cas-21	κ Cas-22	κ Cas-23	κ Cas-24	κ Cas-25	κ Cas-26	κ Cas-27
C	κ Cas-28	κ Cas-29	κ Cas-30	κ Cas-31	κ Cas-32	κ Cas-33	κ Cas-34	κ Cas-35	κ Cas-36	κ Cas-37	κ Cas-38	κ Cas-39
D	κ Cas-40	κ Cas-41	κ Cas-42	κ Cas-43	κ Cas-44	κ Cas-45	κ Cas-46	κ Cas-47	κ Cas-48	κ Cas-49	κ Cas-50	κ Cas-51
E	β lac-01	β lac-02	β lac-03	β lac-04	β lac-05	β lac-06	β lac-07	β lac-08	β lac-09	β lac-10	β lac-11	β lac-12
F	β lac-13	β lac-14	β lac-15	β lac-16	β lac-17	β lac-18	β lac-19	β lac-20	β lac-21	β lac-22	β lac-23	β lac-24
G	β lac-25	β lac-26	β lac-27	β lac-28	β lac-29	β lac-30	β lac-31	β lac-32	β lac-33	β lac-34	β lac-35	β lac-36
H	β lac-37	β lac-38	β lac-39	β lac-40	β lac-41	β lac-42	β lac-43	β lac-44	β lac-45	β lac-46	β lac-47	β lac-48

Placa 4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	β lac-49	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB
B	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB
C	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB
D	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB
E	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB
F	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB	PPB
G	Leche	caseínas	α -Caseína	β -Caseína	κ -Caseína	α -Lacto	β -Lacto	(0.3 mg/ml)	PPB	PPB	PPB	PPB
H	Leche	caseínas	α -Caseína	β -Caseína	κ -Caseína	α -Lacto	β -Lacto	(0.1 mg/ml)	PPB	PPB	PPB	PPB

Impresión

Para imprimir los péptidos estos fueron transferidos a una placas de 384. Los péptidos se imprimieron por duplicado (dos copias de tres) en cristales tratados y recubiertos con superficie epoxi para facilitar la unión covalente a la superficie de los péptidos inmovilizados (SuperEpoxy2 Substrate, ArrayIt). Se empleó el robot de impresión NanoPrint™ Microarrayer 60 (TeleChem International, Inc.).



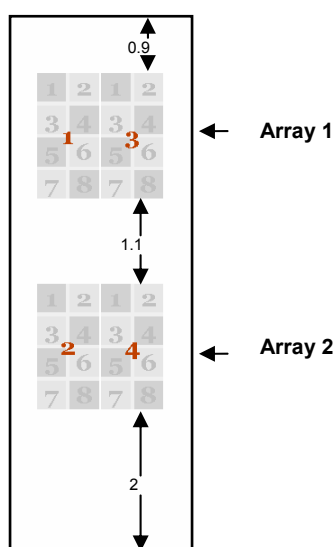
Figura 18. Robot de impresión con capacidad para 3 placas de 384 para muestras y 60 cristales de impresión.

Una vez impresos, los cristales fueron almacenados hasta su uso posterior a 4°C. Se imprimieron elementos adicionales en el ensayo α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseinas y β -lactoglobulina como controles positivos. Se empleó buffer de impresión como control negativo y para normalizar el ruido de fondo. Albúmina sérica bovina (BSA) marcada con fluorocromo fue utilizada como control de localización.

Inmunoensayo

Se delimitó el área alrededor de la zona de impresión utilizando un rotulador de tinta hidrofóbica (DakoCytomation Pen, Dako). Cada cristal se empleó para dos pacientes distintos (Figura 19). Todos los sueros de los pacientes incluidos en el estudio fueron testados el mismo día en paralelo.

Figura 19. Esquema de impresión de los cristales.

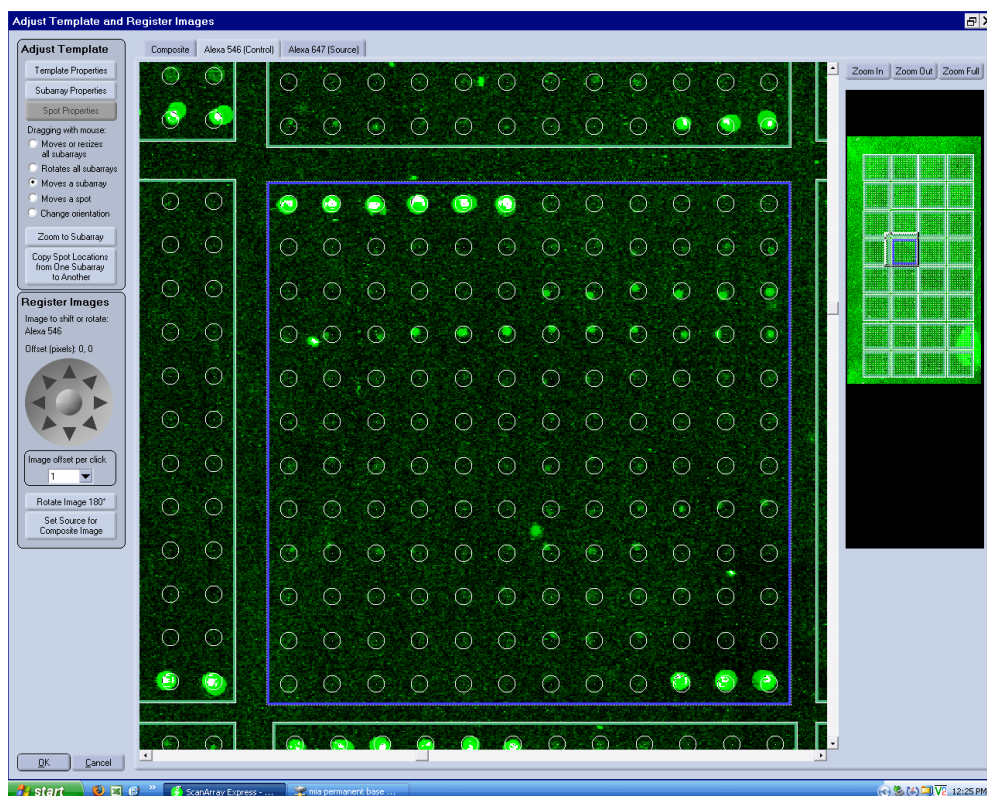


Se comenzó el ensayo lavando los cristales con salino phosphato-buffer con 0.5% tween 20 (PBS-T) y se bloquearon las unions inespecíficas con 500 μ l of 1% HSA in PBS-T (PBS-T/HSA) durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitación lenta (Labline). Las incubaciones se llevaron a cabo en una cámara de tinción para mantener la humedad (The Binding Site). Tras eliminar el PBS-T/HSA de la superficie del cristal por aspiración, se añadieron 200 μ l del suero del paciente diluido 1:5 en PBS-T/HSA y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación lenta. Tras 3 lavados con PBS-T los cristales se incubaron durante 1 hora con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti IgE humana (Phadia) y anti IgG4 humana (Pharmigen) diluidos en PBS-T/HSA (concentración de trabajo 0.4 μ g/ml), que previamente habían sido conjugados con los fluorocromos Alexa 546 y Alexa 647 (Molecular Probes), respectivamente. Finalmente los cristales fueron lavados con PBS-T, centrifugados y

escaneados utilizando ScanArray®Gx (PerkinElmer). Las imágenes fueron guardadas como archivos TIFF para su posterior análisis, referido más adelante.

La figura 20 muestra la imagen obtenida tras el escaneado de uno de los cristales. Los puntos verdes fluorescentes corresponden a péptidos que han sido reconocidos por el anticuerpo (en este caso anticuerpo IgE marcado con Alexa 546).

Figura 20. Imagen obtenida tras el escaneado de un cristal.



4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.4.1 Estadística descriptiva

Se utilizaron la media, mediana, mínimo, máximo y percentiles 25 y 75 para resumir las variables continuas, y frecuencias relativas y absolutas para las variables discretas.

4.4.2 Estadística analítica

4.4.2.1 Para los objetivos del estudio del valor predictivo del valor 2.5 KU/I de IgE específica en determinar la tolerancia y evaluación de las pruebas cutáneas en el diagnóstico de la persistencia de alergia a leche de vaca:

Estudio de diagnóstico

Se compararon los valores de la prueba cutánea entre las poblaciones de niños con PO con leche positiva y negativa mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Se realizó un análisis del rendimiento diagnóstico de la prueba cutánea y la determinación de IgE específica mediante curvas ROC.

Se calcularon los índices de validez (sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo, cocientes de probabilidad positivo y negativo) para la prueba cutánea y la determinación de IgE específica.

Índices de validez

El resultado de una prueba puede ser positivo (en el caso de la prueba cutánea $\geq 3\text{mm}$ es el punto de corte más aceptado en diagnóstico) o negativo (prueba cutánea $< 3\text{mm}$). Para evaluar la validez de esta prueba habrá que aplicarla a una muestra de individuos que se sepa que tienen la enfermedad y a otra que se sepa que no la tiene. La provocación oral con leche nos clasifica a los pacientes en enfermo/alérgico, o sano/tolerante. Los resultados de las pruebas y de la provocación pueden expresarse en una tabla 2x2. Si la prueba fuera perfectamente válida $b=c=0$.

La *sensibilidad* (*Sen*) o proporción de verdaderos positivos es la probabilidad de que la prueba dé positivo condicionada a que el individuo esté enfermo.

La *especificidad* (*Esp*) o proporción de verdaderos negativos es la probabilidad de que la prueba dé negativo condicionada a que el individuo no esté enfermo.

$$\text{Sen} = a / a+c$$

$$\text{Esp} = d / b+d$$

Ya que lo que el clínico conoce en la práctica diaria es el resultado de la prueba y lo que desconoce es el estado de enfermo o sano del paciente, resultan de mayor utilidad clínica los valores predictivos.

El *valor predictivo positivo (VPP)* es la probabilidad de que el individuo esté enfermo condicionada a que la prueba dé positivo.

El *valor predictivo negativo (VPN)* es la probabilidad de que el individuo esté sano condicionada a que la prueba dé negativo.

$$\text{VPP} = a / a+b$$

$$\text{VPN} = d / c+d$$

Sin embargo los valores predictivos dependen de la prevalencia, lo que limita tremendamente su aplicabilidad clínica. Otros índices de utilidad para la práctica clínica diaria y que no dependen de la probabilidad preprueba de la enfermedad (prevalencia) son los cocientes de probabilidad.

El *cociente de probabilidad positivo (CP+)* es la razón entre la probabilidad de que la prueba dé positivo en los pacientes que tienen la enfermedad versus los que no la tienen.

El *cociente de probabilidad negativo (CP-)* es la razón entre la probabilidad de que la prueba dé negativo en los pacientes que tienen la enfermedad versus los que no la tienen.

$$\text{CP+} = \text{Sen} / 1 - \text{Esp}$$

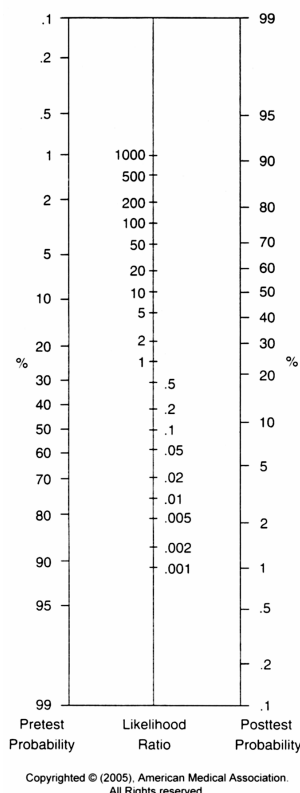
$$\text{CP-} = 1 - \text{Sen} / \text{Esp}$$

Como guía aproximada del valor informativo de los CP tanto positivos como negativos se puede utilizar la tabla de Jaeschke¹⁷⁹.

Tabla 10. Valor informativo de los cocientes de probabilidad.

CP (+)>10 ò CP(-) <0,1	Cambios amplios
5 <CP (+)<10 ó 0,1<CP (-)<0,2	Cambios moderados
2<CP (+)<5 ò 0,2<CP (-)<0,5	Cambios pequeños
1<CP (+)<2 ó 0,5<CP (-)<1	Cambios insignificantes

Datos tomados de Jaeschke¹⁷⁹.

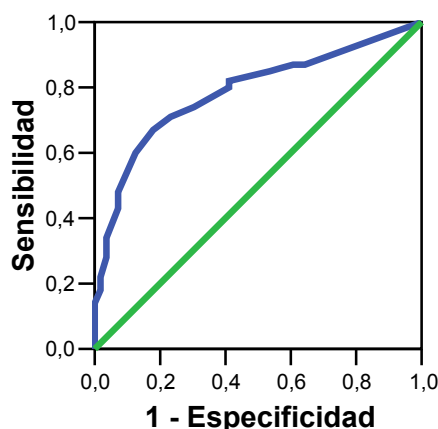
Figura 21. Nomograma Fagan.

Los CPs permiten transformar la probabilidad preprueba en una probabilidad posprueba mediante el Nomograma de Fagan (Figura 21).

Curvas ROC.

La realización de pruebas cutáneas (y la determinación de anticuerpos IgE específicos) producen resultados continuos (mm o KU/l). El comportamiento de dichas pruebas depende de donde se ponga el punto de corte y lo habitual es que exista un grado variable de solapamiento en la función de probabilidad de la variable resultado.

Si se desplaza el punto de corte en un sentido (valores mayores de mm de pápula) disminuyen los falsos positivos pero aumentan los falsos negativos o, en otros términos, disminuye la sensibilidad y aumenta la especificidad e inversamente si se desplaza en el otro sentido, de modo que un problema en estas pruebas es la selección del punto de corte óptimo. Para caracterizar su comportamiento se usan las llamadas curvas ROC. En ellas se presenta la sensibilidad en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad) para distintos puntos de corte (Figura 22).

Figura 22. Curva ROC.

- Si la prueba fuera perfecta, es decir, sin solapamiento, hay una región en la que cualquier punto de corte tiene sensibilidad y especificidad iguales a 1: la curva sólo tiene el punto de coordenadas (0,1).
- Si la prueba fuera inútil: ambas funciones de probabilidad coinciden y la sensibilidad (verdaderos positivos) es igual a la proporción de falsos positivos, la curva sería la diagonal de (0,0) a (1,1).
- Las pruebas habituales tienen curvas intermedias.

Un parámetro para evaluar la bondad de la prueba es el área bajo la curva que tomará valores entre 1 (prueba perfecta) y 0,5 (prueba inútil). Puede demostrarse, que este área puede interpretarse como la probabilidad de que ante un par de individuos, uno enfermo y el otro sano, la prueba los clasifique correctamente. El punto de corte óptimo se consideró aquel que maximiza sensibilidad y especificidad.

Se aceptó como nivel de significación un error alfa (p) < 0.05 en todos los contrastes.

4.4.2.2 Para el estudio de determinación de epítomos lineales mediante microarray.

La señal de fluorescencia procedente de dos canales distintos (para IgE y para IgG4) se digitalizó con el 'ScanArray Express Microarray Analysis System (PerkinElmer)' y exportado como archivo ASCII delimitado por comas. La intensidad de cada 'spot' se expresó como el

ratio señal/ruido (SNR). Se empleó el software 'R' (version 2.5.0. R project Foundation) para normalizar los datos. Los elementos individuales con un coeficiente de variación grande fueron eliminados del análisis. Los controles negativos se emplearon para definir la intensidad del fondo. Para asegurar la comparabilidad intra-ensayo, los valores fueron transformados logarítmicamente para normalización y homogenización de la varianza y posteriormente ajustada la mediana de cada ensayo a 1. Se exploraron las señales de IgE e IgG4 individualmente, pero en el análisis final sólo se consideraron positivas intensidades de SNR de la ratio IgE/IgG4 por encima de un valor umbral de 1. El presente estudio explora pacientes con niveles bajos de IgE y con características clínicas similares, la única diferencia entre los dos grupos incluidos de pacientes (tolerantes y reactivos) fue el resultado de la PO con leche. Por este motivo el análisis se centró en encontrar aquellas regiones de unión de IgE que pudiesen predecir el resultado de la prueba. Evidentemente existe un riesgo de perder posibles regiones alergénicas utilizando esta aproximación, pero se prefirió ganar en especificidad.

Ha sido demostrado en estudios previos que aquellos pacientes alérgicos a alimentos que alcanzan la tolerancia, presentan mayores ratios de IgG4/IgE específica frente al alimento implicado, en comparación con aquellos pacientes con alergia persistente. Ha sido igualmente propuesto que el mantenimiento de la tolerancia a la leche de vaca se asocia la presencia de niveles elevados de IgG4 específica. Evaluando IgE/IgG4 se pretendió focalizar el análisis en los epítomos clínicamente relevantes, dado que el objetivo es diferenciar entre paciente tolerantes y pacientes reactivos.

Se determinó la frecuencia absoluta de pacientes que reconocían cada péptido. Aquellas zonas reconocidas por más del 75% de los pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca fueron considerados epítomos. Posteriormente se buscaron aquellos estadísticamente asociados al grupo de pacientes reactivos. El test exacto de Fisher se empleó para determinar la asociación estadística y se consideró como significativo un p valor ≤ 0.05 .



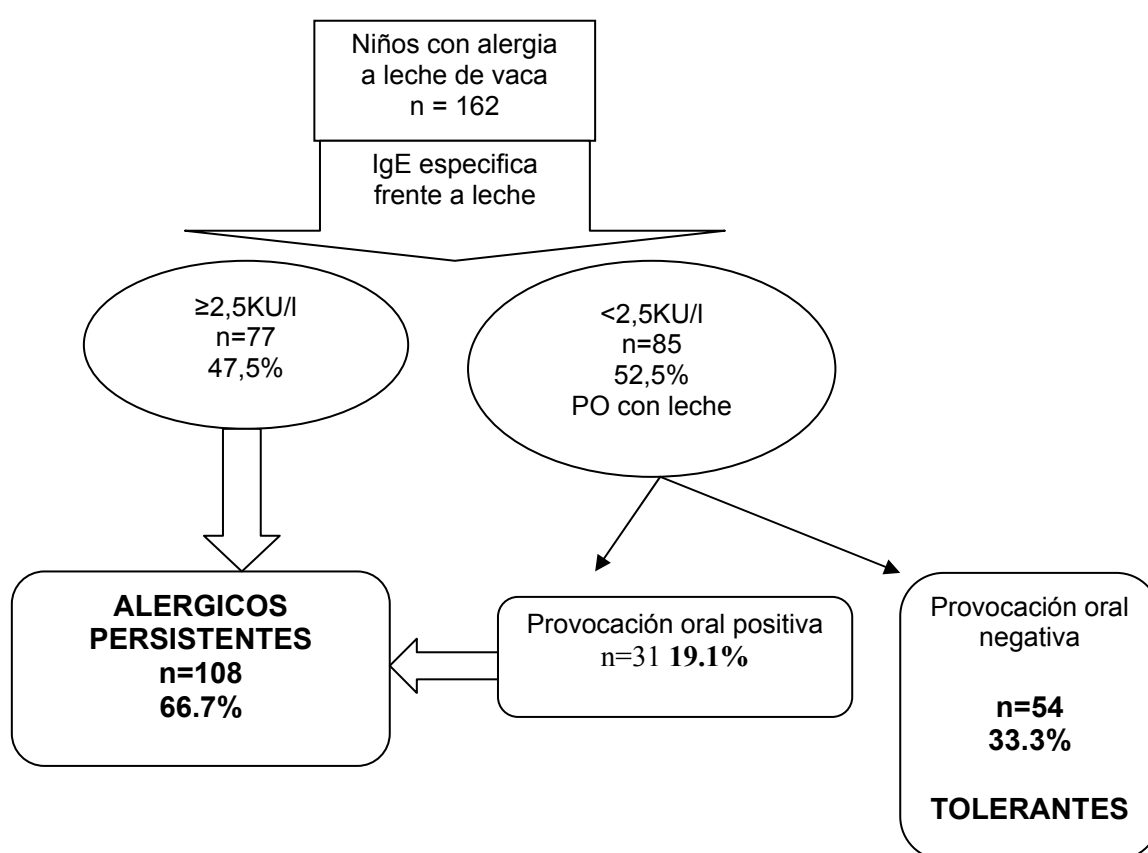
Capítulo 5

RESULTADOS

5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES.

Se seleccionaron de forma consecutiva, desde Enero de 2003 a Enero de 2005, 162 niños diagnosticados de APLV mediada por IgE, en seguimiento en la consulta de Alergia, cuyos padres accedieron a la inclusión de su hijo en el estudio y firmaron el consentimiento informado (Figura 23). Del total de 162 pacientes, 85 presentaron una IgE específica frente a leche inferior a 2.5 KU/l y se programó una provocación oral con fórmula adaptada. 54 de esos pacientes no presentaron ninguna reacción durante la prueba y fueron considerados tolerantes.

Figura 23. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos.

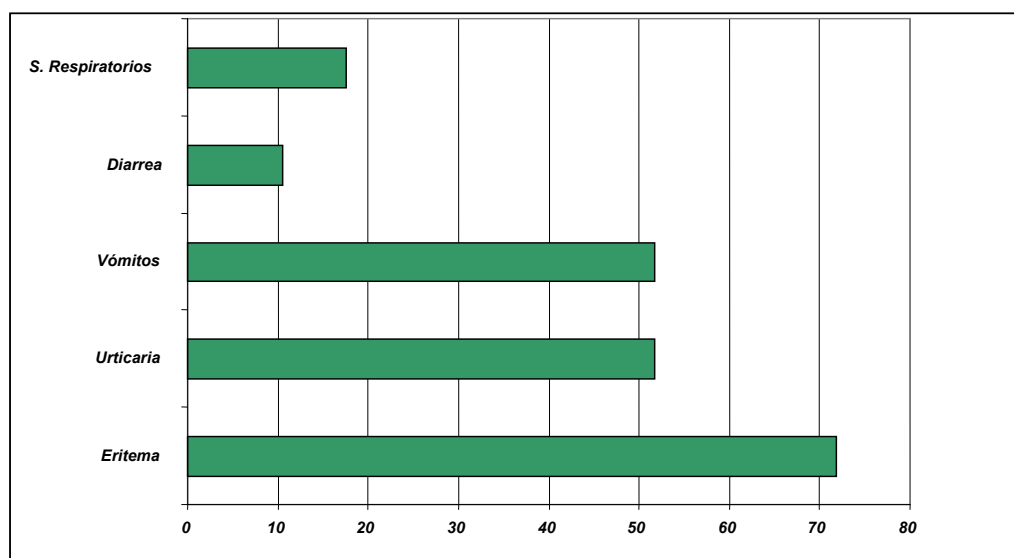


Características clínicas de los pacientes provocados.

De los 85 pacientes provocados, 46 eran niños (54.1%) y 39 niñas (45.9%). Algo menos de la mitad de los pacientes estaban diagnosticados de dermatitis atópica (38 pacientes, 44.7%) y 18 tenían asma (21.2%).

En cuanto a la presencia de alergia a proteínas de huevo, 25 de ellos estaban sensibilizados (28.6%) y 10 estaban diagnosticados de alergia a proteínas de huevo (11,9%).

Los síntomas que presentaron con mayor frecuencia en la primera reacción con la leche fueron cutáneos (el 71.8% de los niños presentó eritema y un 51.8% urticaria). La figura 24 recoge el porcentaje de pacientes con cada uno de los síntomas.

Figura 24. Clínica en la primera reacción tras la ingesta de leche

5.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Se consideró en todos los casos como resultado de la prueba cutánea la media del diámetro mayor y el diámetro ortogonal del habón resultante. Considerando como prueba cutánea positiva aquella en la que se obtiene un diámetro medio mayor o igual a 3mm, 22 de los 85 pacientes presentaron una prueba cutánea negativa (25.9%) frente a leche. Los valores de las pruebas cutáneas con los alérgenos de la leche se encuentran resumidos en su media, mediana, mínimo, máximo, y percentiles 25 y 75. Considerando como valor positivo el valor positivo de IgE específica mayor o igual a 0.35KU/L, 22 pacientes presentaron un valor de IgE frente a leche negativo (25.9%). Los valores de IgE se encuentran resumidos en su media, mediana, mínimo, máximo, y percentiles 25 y 75 (Tabla 10).

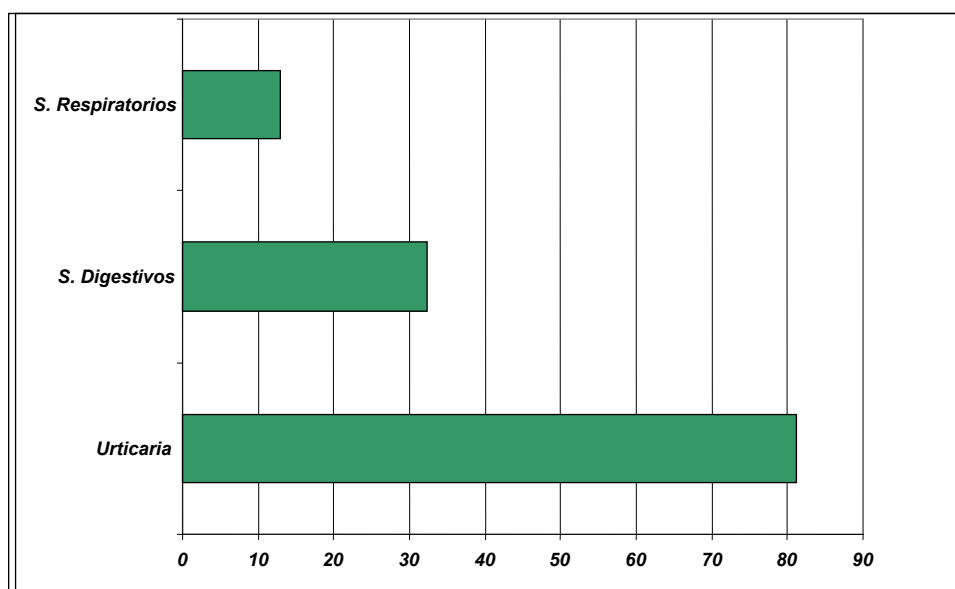
Tabla 10- Resultados de las PC e IgE específicas.

	Media	SD	Mediana	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 75
PC leche	2,34	2,594	2,00	0	11	,00	4,00
PC ALA	4,33	5,208	2,00	0	22	,00	8,00
PC BLG	4,35	5,775	2,00	0	21	,00	7,00
PC CAS	3,45	4,071	2,00	0	17	,00	6,50
IgE LECHE	1,0935	,89098	1,0500	,00	2,50	,0000	2,0000
IgE ALA	,6415	,90584	,0000	,00	4,63	,0000	1,1450
IgE BLG	,2769	,55586	,0000	,00	2,35	,0000	,3725
IgE CAS	1,0317	1,93597	,4900	,00	15,30	,0000	1,3550

5.3 RESULTADOS DE LAS PROVOCACIONES ORALES

54 de los pacientes provocados no presentaron ninguna reacción durante la provocación (63.5%). La clínica más frecuente en las reacciones de las provocaciones positivas fue la clínica cutánea (urticaria) que presentaron el 81.2% de los pacientes, el segundo lugar lo ocupan los síntomas digestivos (32.3%) y en tercer lugar los respiratorios (12.9%). Figura 25.

Figura 25. Clínica durante la provocación con leche.



5.3 DIFERENCIAS ENTRE PACIENTES TOLERANTES Y REACTIVOS

Diferencias clínicas.

Se compararon estas dos poblaciones de pacientes reactivos y tolerantes en cuanto al sexo, los antecedentes personales de dermatitis atópica y el asma bronquial, así como el antecedente de alergia a proteínas de huevo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. (Tabla 11).

Tabla 11. Diferencias en las características clínicas entre los pacientes tolerantes y los alérgicos persistentes.

		REACTIVOS n=31	TOLERANTES n=54	p-valor*	OR
Sexo	Varón	19 (41.3%)	27 (58.7%)	p=0.37	1,5 (0.64-3.88)
	Mujer	12 (30.8%)	27 (69.2%)		
DA	Sí	18 (47.4%)	20 (52.6%)	p=0,07	0.42 (0.17-1.04)
	No	13 (27.7%)	34 (72.3%)		
Alergia a huevo	No	16 (32%)	34 (68.4%)	p=0.476	-
	HS**	10 (41.7%)	14 (58.3%)		
	Si	31 (36.9%)	53 (63.1%)		
Asma	Sí	9 (50%)	9 (50%)	p=0.269	0.49 (0.17-1.40)
	No	22 (32.8%)	45 (67.2%)		

* Prueba de Chi-Cuadrado.

**HS: sensibilización a proteínas de huevo.

La edad fue similar en ambos grupos, siendo la mediana de edad entre los reactivos de 1 año y 2 meses y en los reactivos de 1 año y 5 meses.

Diferencias en las pruebas diagnósticas.

Se analizó si existían diferencias en los valores de prueba cutánea e IgE específica para las distintas fracciones de la leche, entre el grupo de pacientes que toleraron la leche y los que no toleraron. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las determinaciones de IgE específicas. Las pruebas cutáneas con leche y caseína fueron significativamente distintas entre tolerantes y reactivos (Tabla 12).

Tabla 12. Diferencias en los resultados de las pruebas diagnósticas entre los pacientes tolerantes y los reactivos.

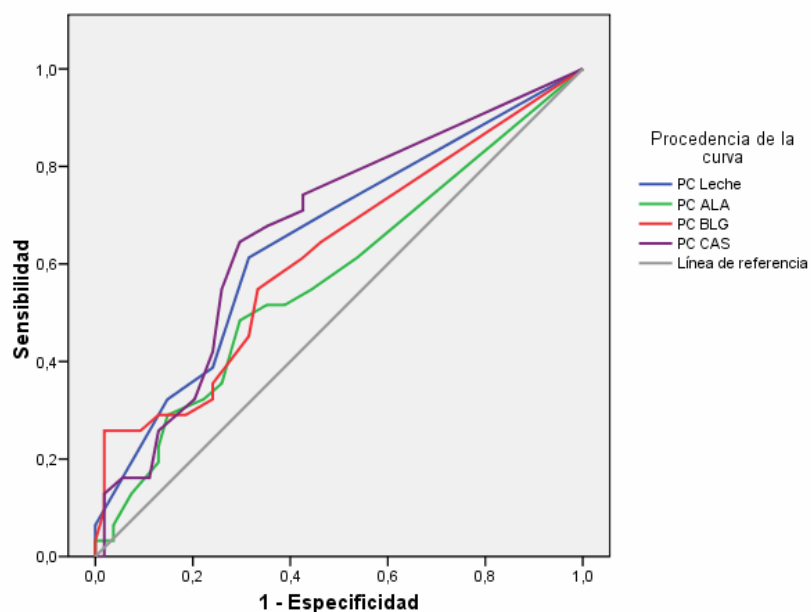
	Alergeno	REACTIVOS n=31	TOLERANTES n=54	p-valor*
PC (mm) Mediana (mín-máx), n	Leche	3 (0-18) n=31	0 (0-9,5) n=54	0.015
	ALA	5 (0-10) n=100	2 (0-5) n= 54	0.245
	BLG	4 (0-10,5) n=100	0 (0-7) n=54	0.049
	CAS	5 (0-19) n=100	0 (0-5) n=54	0.005
IgE específica (KU/I) Mediana (mín-máx), n	Leche	1 (<0,35-2.5) n=31	1.2 (<0,35-2.5) n=53	0.894
	ALA	0.68 (<0,35-2) n=31	<0,35 (<0,35-4.63) n=52	0.105
	BLG	<0,35 (<0,35-1.88) n=29	<0,35 (<0,35-2.35) n=49	0.157
	CAS	0,75 (<0,35-3) n=29	0,36 (<0,35-3.47) n=48	0.102

* Prueba de U de Mann-Whitney.

5.4 VALIDEZ DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Curvas ROC

Se realizó un análisis del rendimiento diagnóstico de las pruebas cutáneas y la determinación de IgE específicas mediante curvas ROC para distinguir entre los pacientes tolerantes y los pacientes reactivos. Las áreas bajo la curva para las distintas pruebas con cada uno de los alérgenos y los puntos de corte óptimos (calculados como la suma de mayor sensibilidad y especificidad) se muestran en las siguientes figuras y tablas.

Figura 26. Curvas ROC de las pruebas cutáneas.**Tabla 13. Áreas bajo la curva de las pruebas cutáneas**

	Área	Error estándar	P valor	IC al 95%	
PC leche	,652	,063	,020	,529	,775
PC ALA	,573	,066	,265	,443	,702
PC BLG	,622	,065	,063	,495	,749
PC CAS	,673	,061	,008	,553	,792

Los puntos de corte óptimos para los alérgenos con mayor rendimiento (leche y caseína) fueron de 3mm para ambos alérgenos, resultando para la leche una sensibilidad de 38.71% (21.56 – 55.86) y una especificidad de 75.93% (64.52 – 87.33), CP+ 1.61 (0.52 – 1.92) y CP- (0.81 (0.74 – 1.34). Para la caseína se encuentra una sensibilidad de 64.52% (47.67 -81.36) y una especificidad de 70.37% (58.19 – 82.55), con un CP+ 2.18 (1.34 – 3.54) y CP- 0.50 (0.30 – 0.84).

Figura 27. Curvas ROC de las determinaciones de IgE específica.

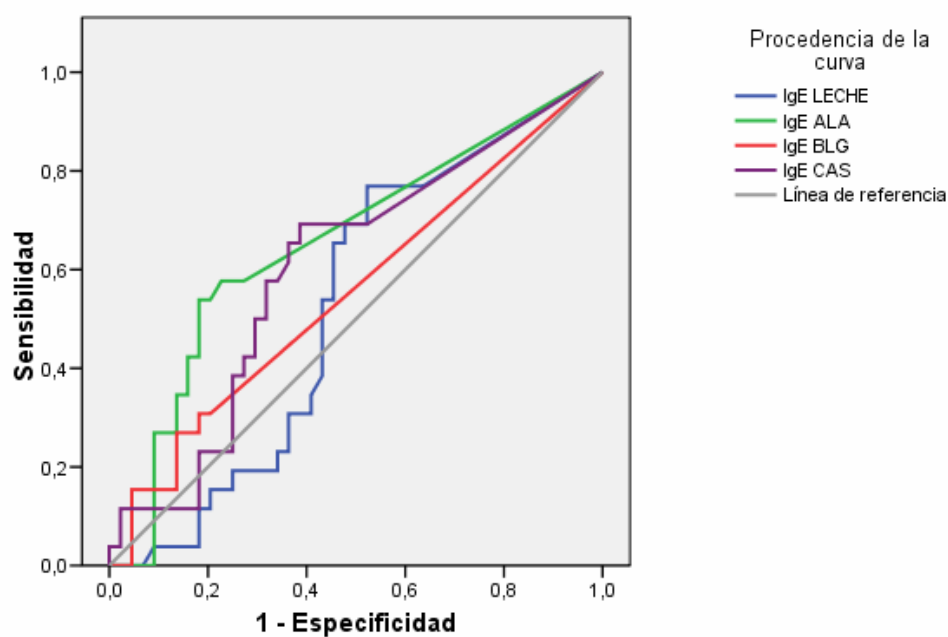


Tabla 14. Áreas bajo la curva de las determinaciones de IgE específica

	Área	Error estándar	p valor	IC al 95%	
IgE LECHE	,526	,070	,715	,389	,663
IgE ALA	,654	,070	,032	,517	,791
IgE BLG	,553	,073	,458	,411	,696
IgE CAS	,604	,070	,146	,466	,742

Dado que el criterio de provocación se fundamenta en el valor de IgE y habiendo obtenido un pobre rendimiento diagnóstico, no se exploraron puntos de corte para estas variables.

5.5 ENSAYO MICROARRAY DE PÉPTIDOS

Características de los pacientes

En un periodo posterior (Enero 2005 a Febrero de 2006), se reclutaron 31 pacientes para llevar a cabo el estudio mediante microarrays de péptidos. 16 de los 31 pacientes incluidos en esta parte del estudio tuvieron una provocación positiva con leche y por lo tanto fueron considerados reactivos (56.6%) y 15 no presentaron ninguna reacción durante la provocación (grupo tolerante). La mediana de la edad fue 2 años y cuatro meses, con un rango entre 1 y 6 años. En el momento del diagnóstico, el síntoma más frecuente fue la afectación cutánea aislada (urticaria) en el 58.6% de los pacientes, seguida urticaria y vómitos en el 25.8 % de los pacientes. Se llevaron a cabo provocaciones orales simple ciego en 29 pacientes. Los otros dos pacientes tuvieron síntomas en el domicilio en las dos horas posteriores a una ingesta accidental de leche, el primero de ellos tuvo una urticaria y el segundo urticaria y vómitos. Un paciente tuvo una ingesta accidental no sintomática en el domicilio que se confirmó con una provocación en el hospital.

La mediana de IgE total fue 70 KU/l (2 - > 2000) en el grupo de los tolerantes y 39 kU/l (17-323) en el grupo reactivo. La mediana de la IgE específica de leche fue de 2.1 kUA/l (0.39-7.32) en los tolerantes frente a 1.9 kUA/l (0.38-13) en el grupo reactivo. En la tabla 13 se recogen las manifestaciones clínicas, edad, sexo y niveles de IgE específica en ambos grupos de pacientes.

Tabla 15. Características clínicas de ambos grupos de pacientes.

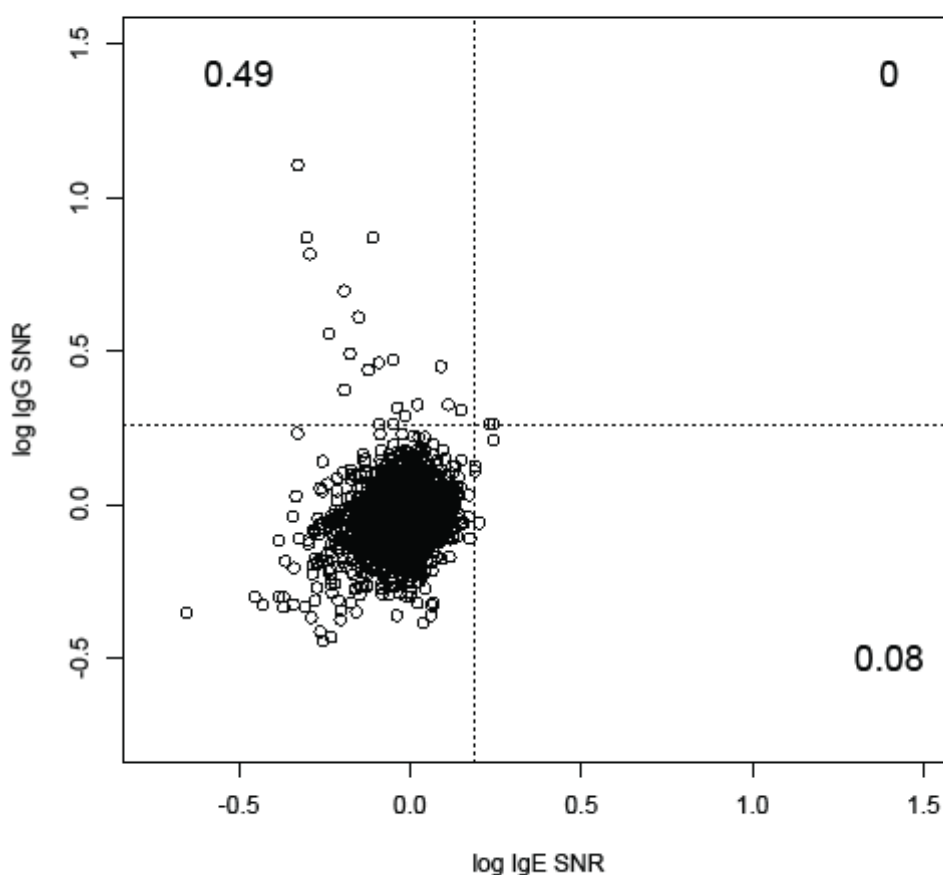
		TOLERANTES (n=15)	REACTIVOS (n=16)
Edad (mediana)*		2 años 2 meses	2 años 4 meses
Sexo		6 niños	9 niños
IgE total *		70 kU/l (2->2000)	39 kU/l (17-323)
IgE Leche *		2.1 kU _A /l (0.39-7.32)	1.9 kU _A /l (0.38-13)
Síntomas con la ingesta de leche	cutáneos	8 (53.3%)	8 (50%)
	cutáneos + digestivos	5 (33.3%)	3 (18.8%)
	cutáneos + respiratorios	2 (13.3%)	4 (25%)
	anafilaxia	0	1 (6.3%)

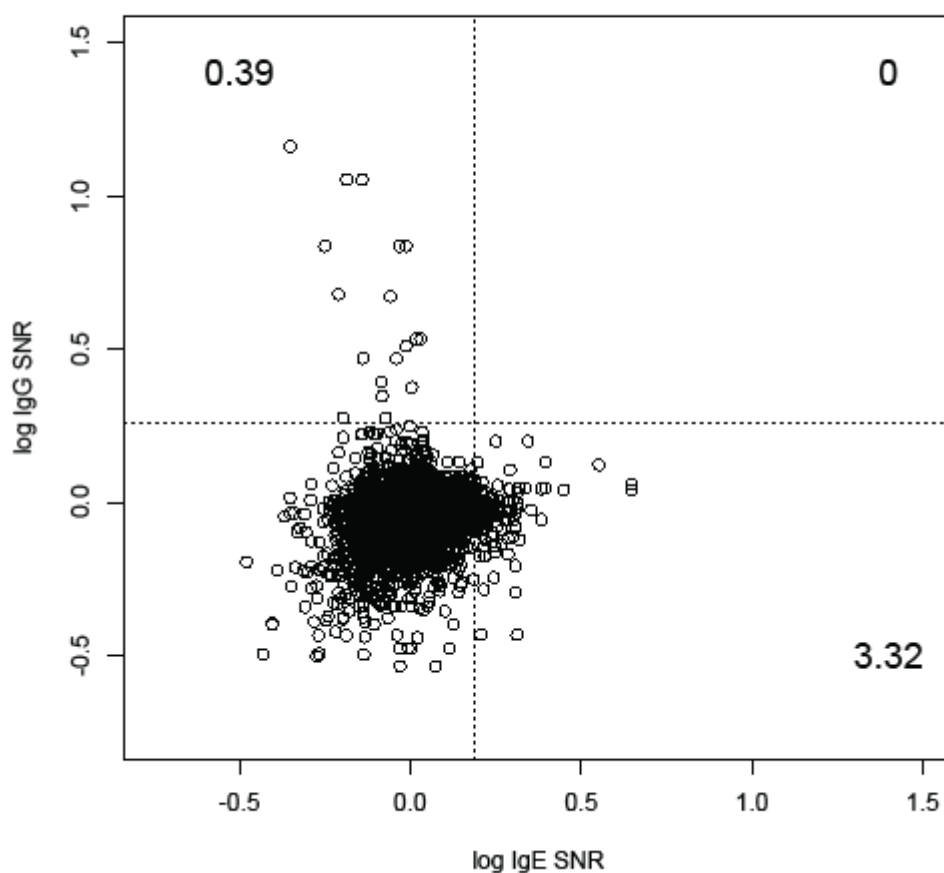
***Edad y niveles de IgE total e IgE específica frente a leche en el momento de la provocación.**

Reactividad IgE e IgG4 frente a los péptidos en pacientes reactivos y pacientes tolerantes.

La unión de anticuerpos de la clase IgE e IgG4 frente a los péptidos de as1-, as2-, b-, k-caseínas y b-lactoglobulina fue detectada simultáneamente usando dos canales de fluorescencia. La figura 28 muestra la unión IgE e IgG4 frente a los péptidos estudiados. Como se puede observar, la unión IgG4 es similar en ambos grupos mientras que la unión IgE es sustancialmente superior en el grupo reactivo, reconociendo el 3.32% del total de los péptidos estudiados.

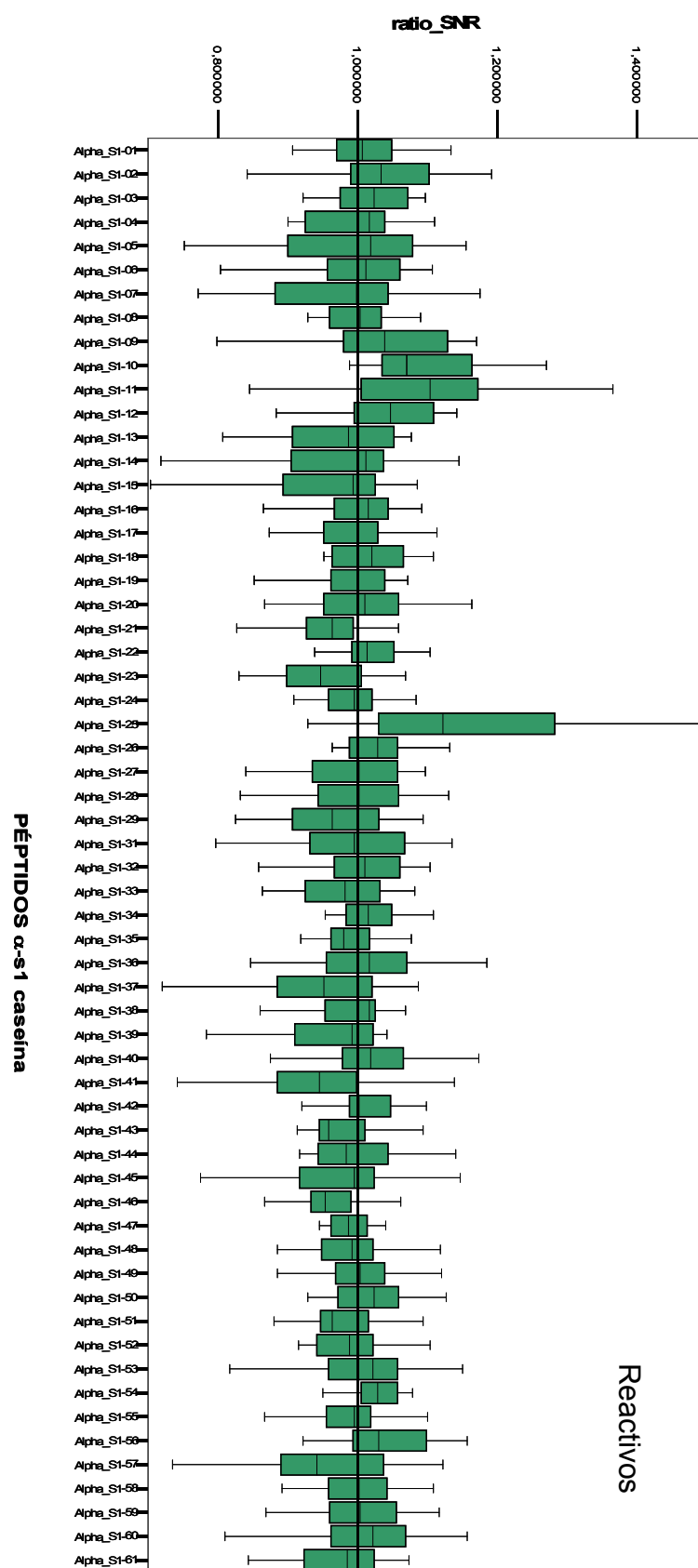
Figura 28. Reconocimiento global de péptidos en ambos grupos de pacientes.

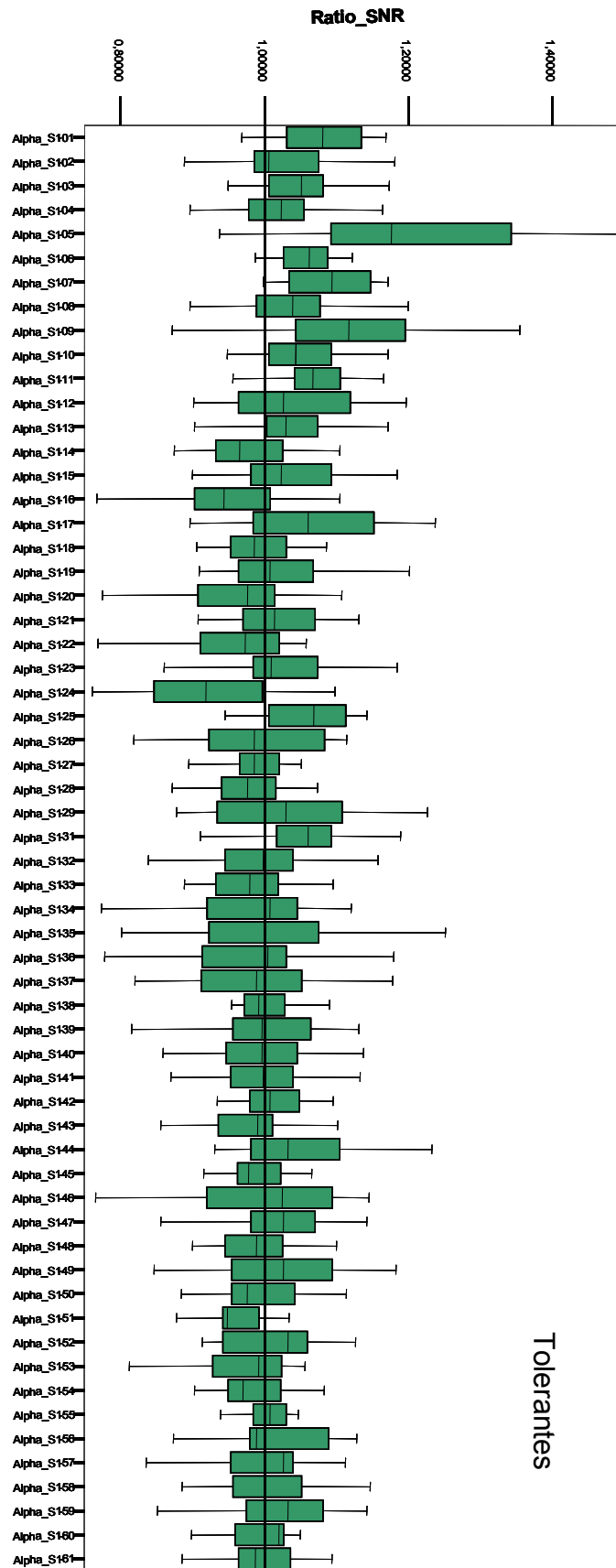


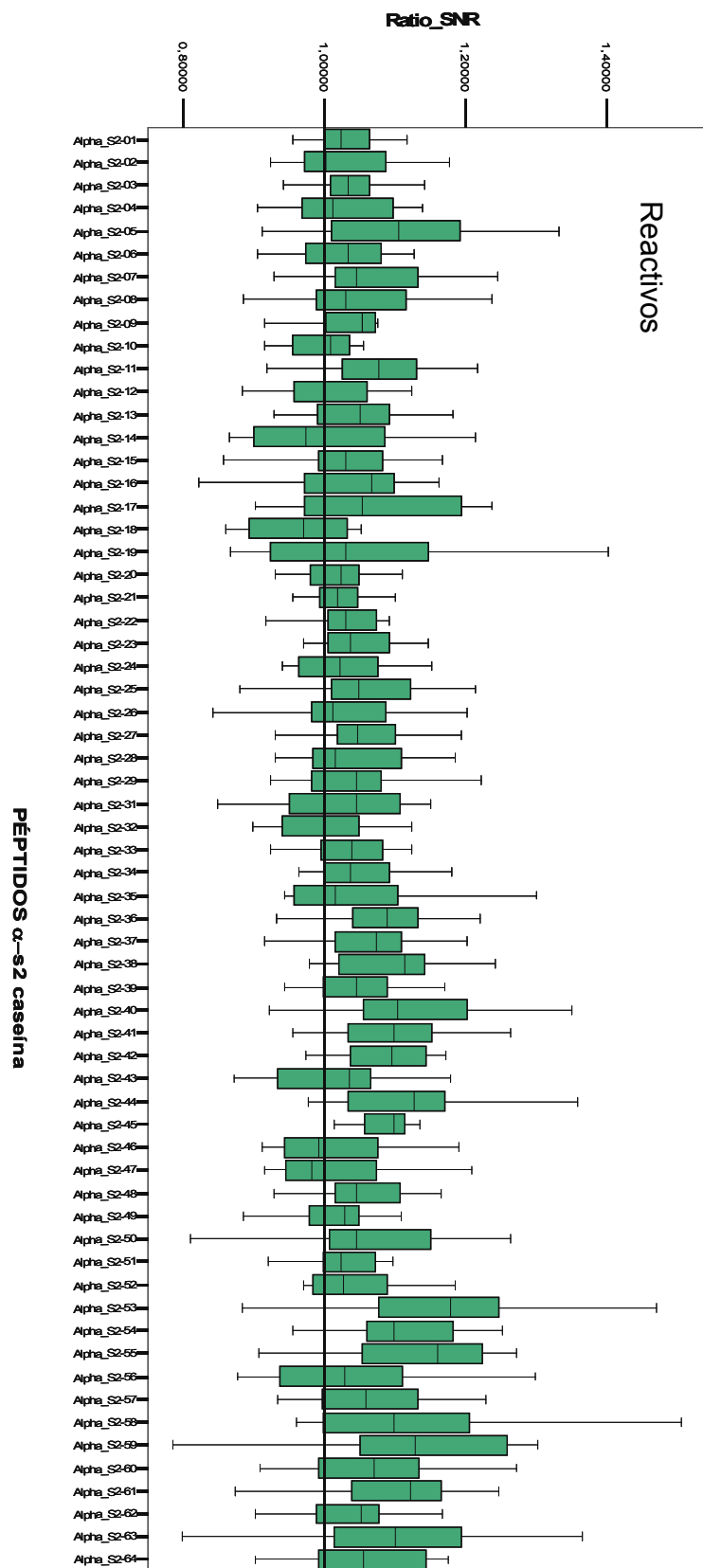


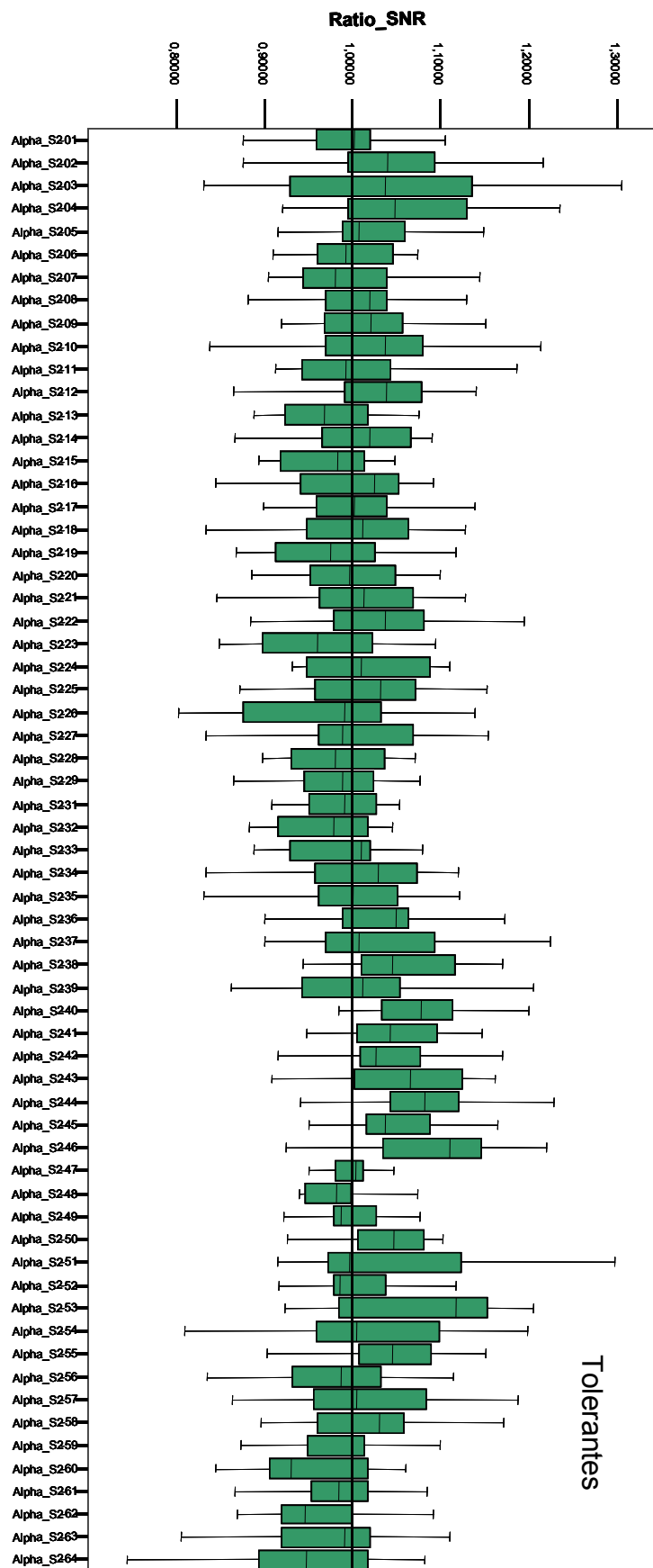
A continuación se muestra el reconocimiento de cada péptido individual en cada una de las 5 proteínas estudiadas. Tal y como se explica en la sección de métodos se decidió expresar el resultado considerando el ratio IgE/IgG4 SNR , considerando como positivos todos aquellos con un valor por encima de 1. En la fig—se representa mediante un gráfico de cajas, en el eje y la mediana de intensidad y los percentiles 25-75 (las líneas representan los valores máximo y mínimo). En el eje x aparece representado cada uno de los péptidos. Se muestran separadamente las distribuciones de tolerantes y reactivos. Figura 29.

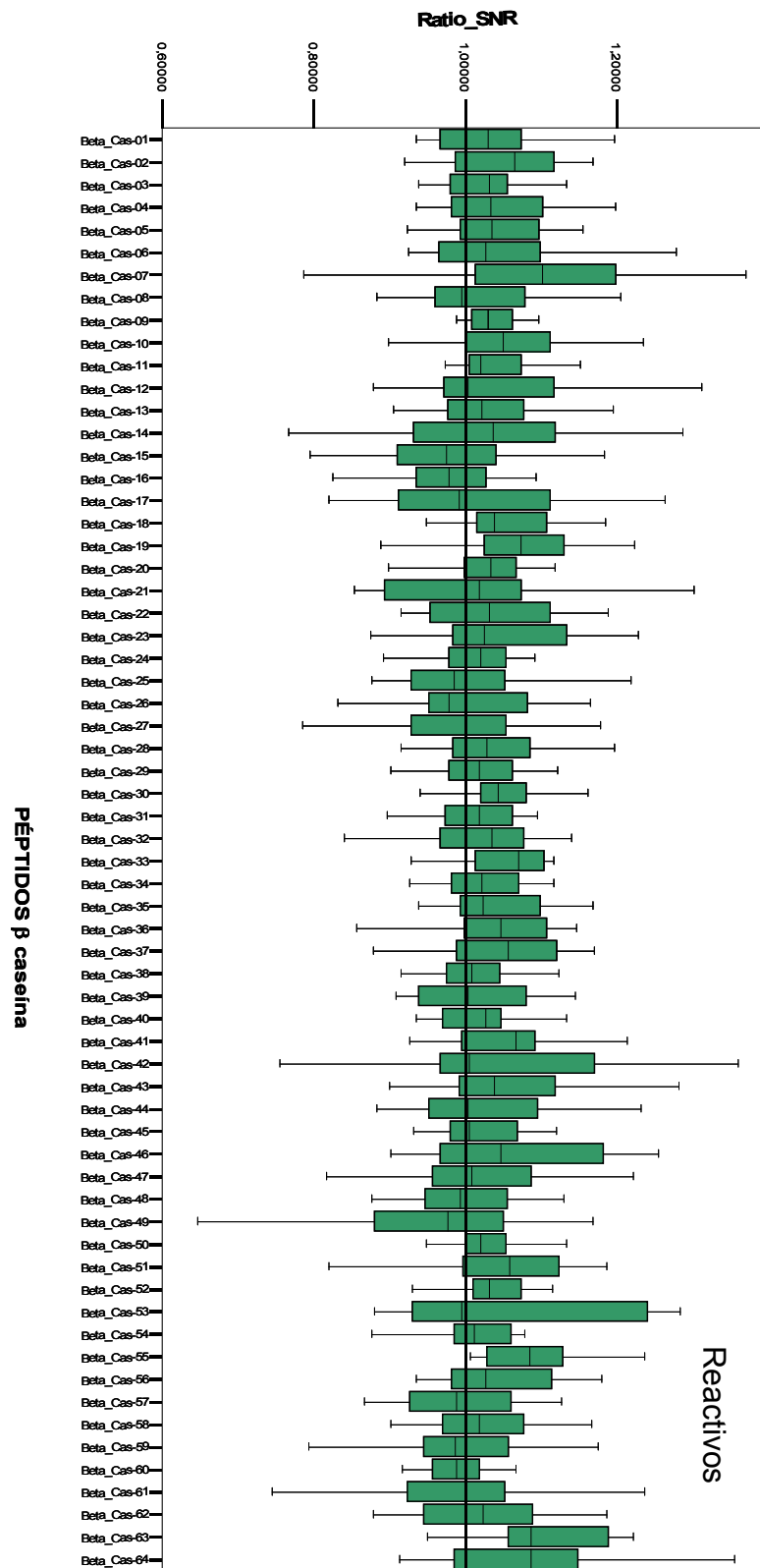
Figura 29. Reconocimiento de cada uno de los péptidos estudiados

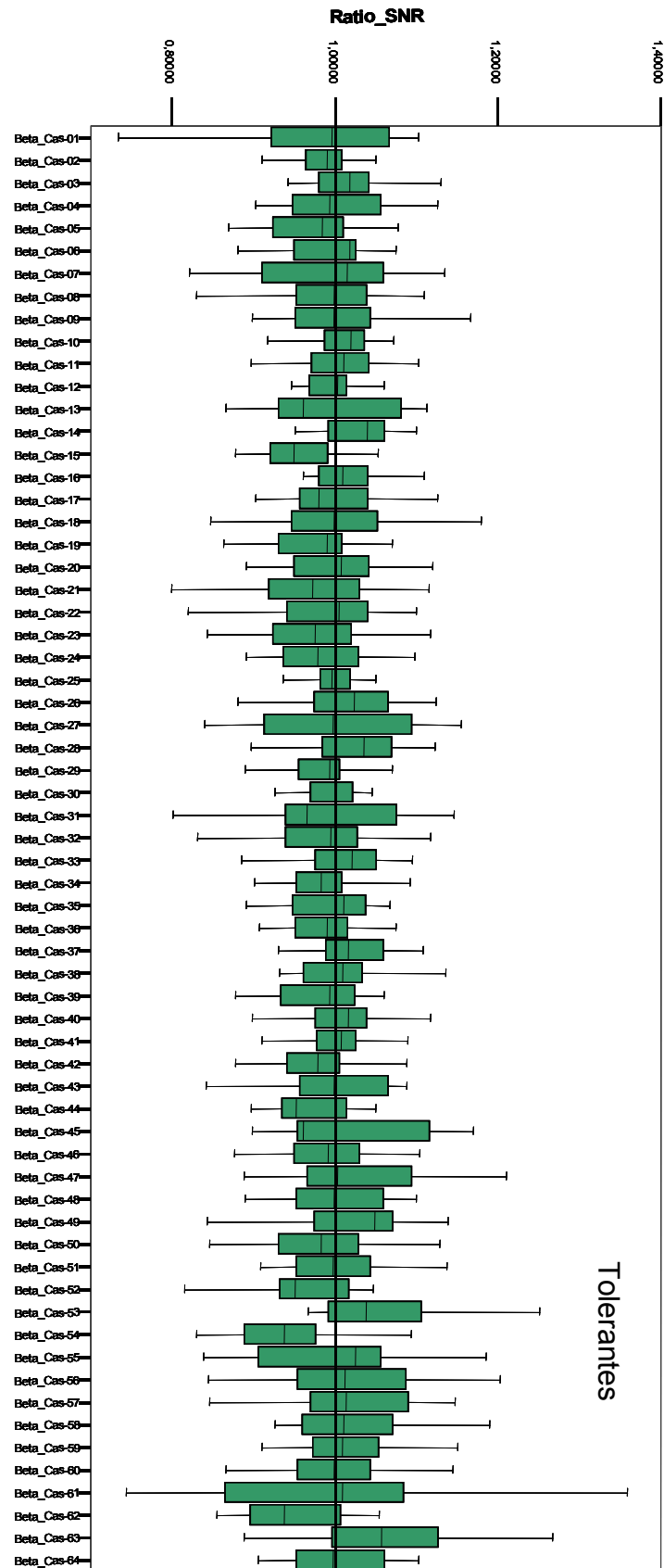


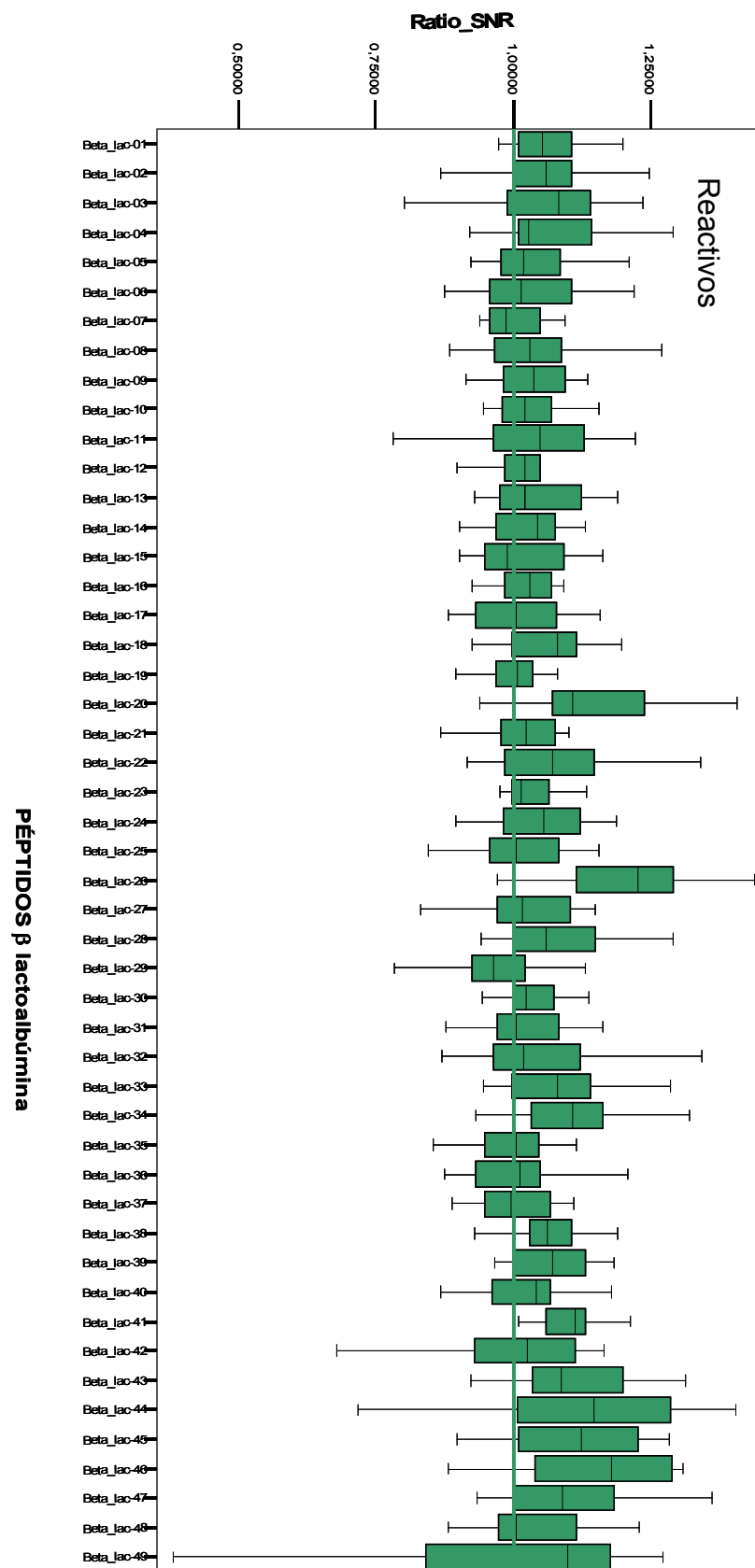


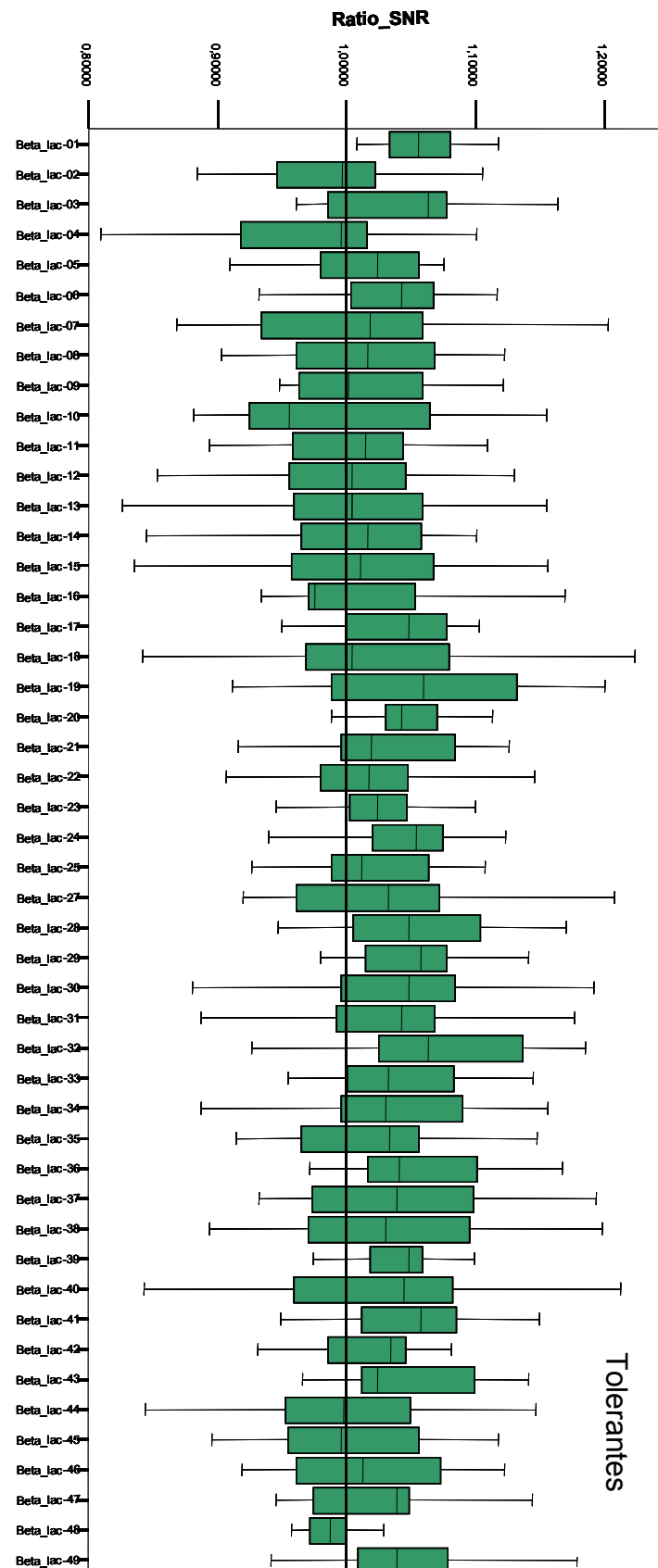


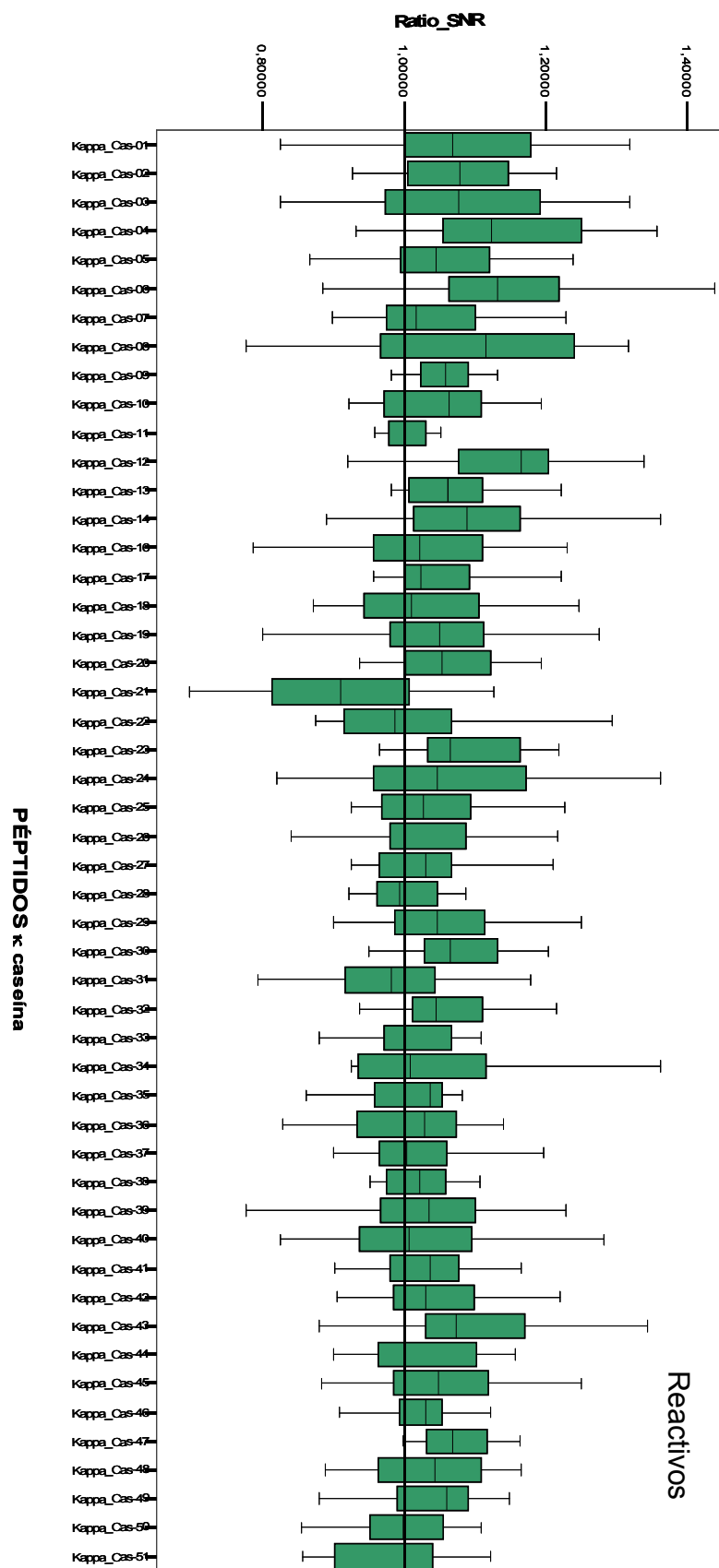


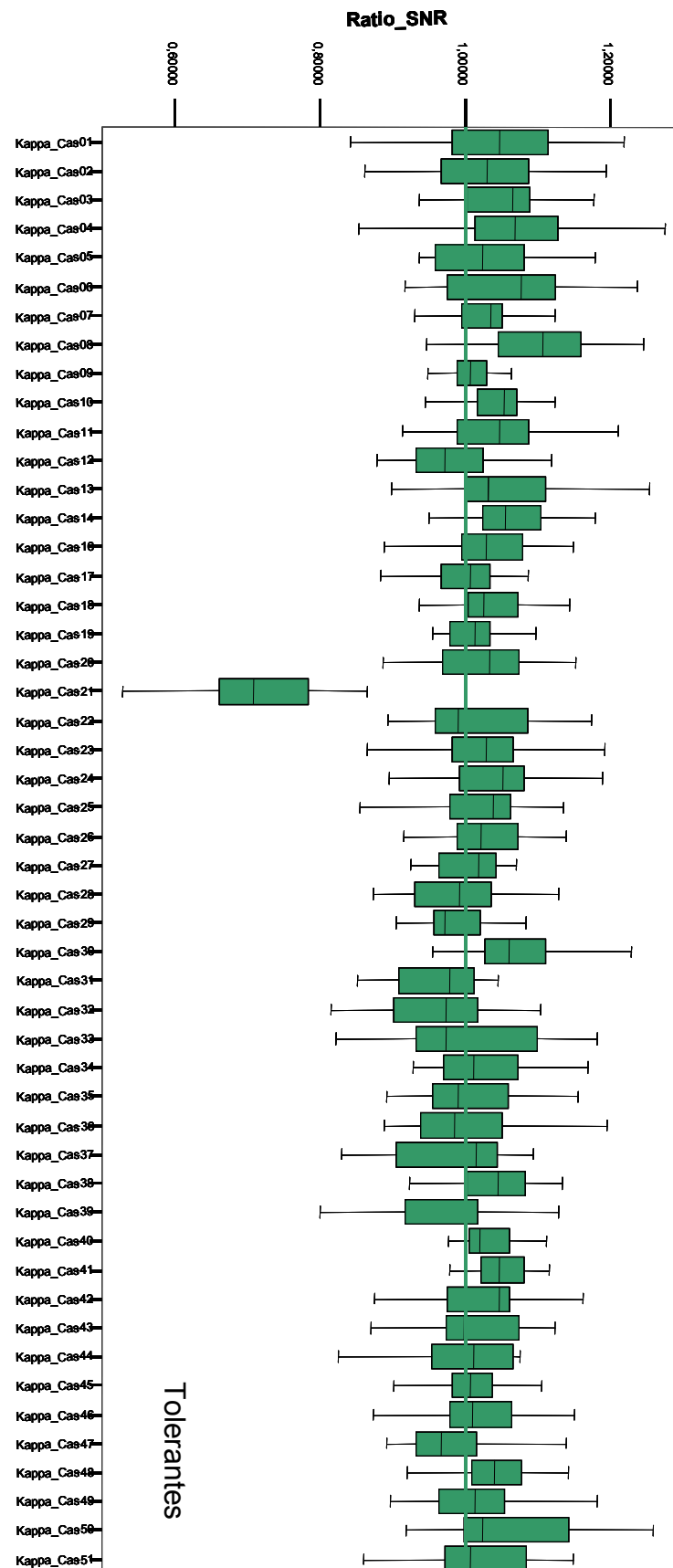












Una vez explorado el reconocimiento de cada uno de los péptidos, se buscaron aquellos péptidos reconocidos de forma mayoritaria por los pacientes incluidos. Varios péptidos de las proteínas de la leche estudiadas, han sido reconocidos por más del 75% de los pacientes reactivos (Tabla 16) y fueron por lo tanto considerados como epítomos.

Tabla 16. Péptidos reconocidos por más del 75% de los pacientes reactivos.

PROTEINA	α_{s1}- caseína	α_{s2}- caseína	β- caseína	β-lactoglobulina	κ-caseína
AA	16-35	1-20	25-50	58-77	16-35
	28-50	13-32	52-74	76-95	34-53
	73-92	67-82	121-140	121-140	
		106-125	164-173		
		122-141			
		157-182			
		181-207			

Se continuó el análisis identificando aquellos péptidos del grupo anterior que fueron reconocidos de forma significativamente distinta por los pacientes reactivos y tolerantes. La tabla 15 compara el porcentaje de reconocimiento en cada uno de los grupos junto a su nivel de significación. Como se puede observar, se han encontrado 10 epítomos que muestran un reconocimiento significativamente mayor en el grupo de los pacientes reactivos y por lo tanto permitirían clasificar mejor a los pacientes en cada grupo. Estos epítomos son: α s1 caseína: AA 28-50, α s2: AA 1-20, 13-32, 67-86 y 181-207. β -caseína: AA 25-50, 52-74 y 154-173. β -lactoglobulina: AA 58-77. κ -caseína: AA 34-53.

Aquellos epítomos de la tabla 16 que no aparecen en la tabla 17 no tuvieron un reconocimiento diferencial entre ambos grupos de pacientes.

Tabla 17. Porcentaje de reconocimiento y nivel de significación entre el grupo de pacientes reactivos y tolerantes.

	AA	Reactivos	Tolerantes	p valor
α_{s1} - caseína	28-50 ¹	75%	26.7%	0.012
α_{s2} - caseína	1-20 ²	75%	13.3%	0.001
	13-32 ³	75%	26.7%	0.012
	67-86 ⁴	75%	33.3%	0.032
	181-207 ⁵	75%	20%	0.004
β - caseína	25-50 ⁶	75%	33.3%	0.032
	52-74 ⁷	81.3	26.7%	0.004
	154-173 ⁸	75%	33.3%	0.032
β -lactoglobulina	58-77 ⁹	81.3%	40%	0.029
κ -caseína	34-53 ¹⁰	87.5%	40%	0.009

¹ FPEVFGKEKVNELSKDIGSESTE,

² KNTMEHVSSEESIISQETY,

³ SIISQETYKQEKMAINPSK

⁴ EEVKITVDDKHQKALNEIN,

⁵ KTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL,

⁶ INKKIEKFQSEEQQTEDELQDKIH,

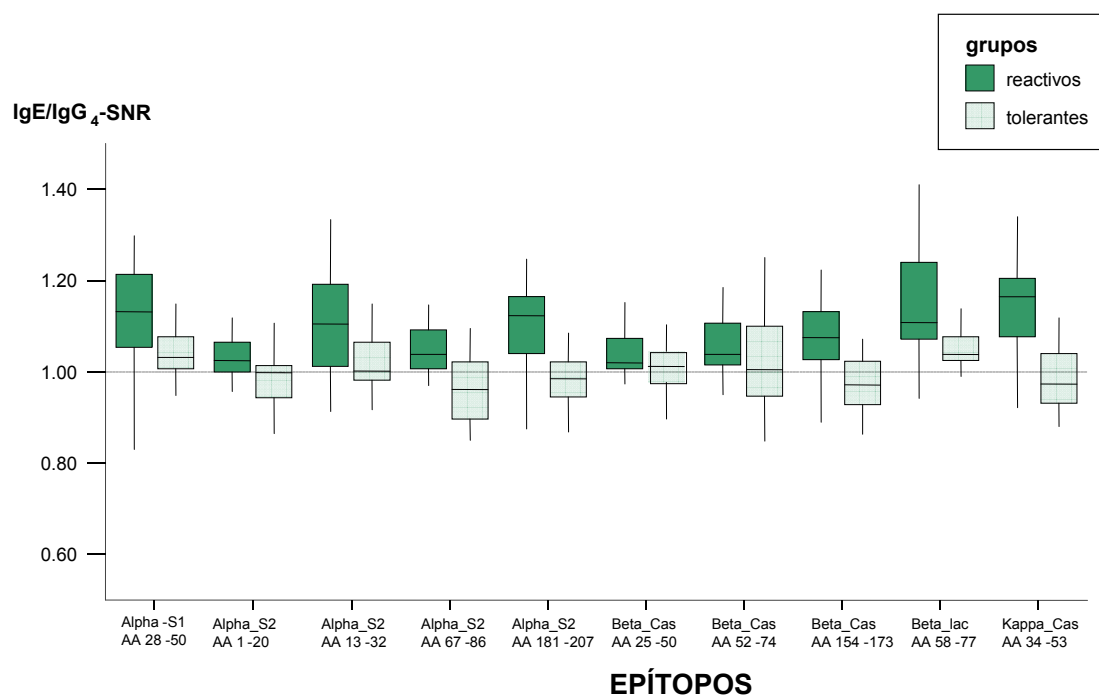
⁷ FAQTQSLVYPFGPIPNLQNI,

⁸ TVMFPPQSVLSLSQSKVLPV,

⁹ LQKWENDECAQKKIIAEKTK,

¹⁰ RYPSYGLNYYQKPVALLNN

Figura 30. Epítomos reconocidos por los pacientes reactivos



La figura 30 muestra gráfico de cajas en el que se en el 'eje x' se representa cada epítipo identificado en los grupos reactivo y tolerante y en el eje 'y' se representa la señal de fluorescencia como ratio IgE/IgG4 SNR. Se muestra la mediana, el 1º y 3º cuartil de SNR para cada uno de los péptidos de 20-mer.



Capítulo 6

DISCUSIÓN

La alergia alimentaria es una patología que predomina claramente en la edad pediátrica, y su prevalencia oscila según las fuentes entre 0.5% y 2,7% de la población general en los primeros años de vida¹⁸⁰. Los alimentos, y entre ellos la leche, son causa de reacciones sistémicas graves, produciendo mayoritariamente manifestaciones clínicas a nivel de la piel, pero también, síntomas digestivos y respiratorios; de hecho la alergia alimentaria es la principal causa de reacciones anafilácticas tratadas en los servicios de Urgencias hospitalarias^{70,73,77,181-183}. Una vez alcanzado el diagnóstico, y hasta el momento de su resolución, el único tratamiento disponible y eficaz es evitar estrictamente la ingesta del alimento en todas sus formas y derivados. La dieta de evitación de este alimento resulta especialmente problemática en los niños, dada la importancia nutricional del mismo, y su ubicuidad. Esta difícil situación se prolonga en el tiempo hasta que se alcanza la tolerancia. En la búsqueda de dicho paso de la alergia a la tolerancia disponemos de una serie de pruebas, como las pruebas cutáneas y la determinación de anticuerpos IgE específicos, que orientan acerca del momento evolutivo de la enfermedad en el que se encuentra el paciente. Estas pruebas han demostrado limitaciones a la hora de predecir el momento de tolerancia y no nos permiten conocer con total certeza el momento en el que se produce ese paso de alérgico a tolerante, sin prolongar de forma innecesaria las restricciones dietéticas.

6.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DISPONIBLES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA HABITUAL.

La prueba cutánea y la IgE específica son pruebas que demuestran una sensibilización frente a un determinado alérgeno. En los últimos años diversos autores han publicado estudios en los que se ha intentado definir la utilidad de la prueba cutánea y la determinación de IgE específica como predictores de reactividad clínica, determinada esta última por el resultado de la PODCCP, que se considera la prueba patrón oro.

La validez de una prueba de diagnóstico es la capacidad de la misma para clasificar correctamente a un individuo, en enfermo o no. Los índices para evaluar esa validez son la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos. El valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) son índices de gran utilidad, pero dependen de la prevalencia

de la enfermedad. Otra forma de expresar los resultados son los cocientes de probabilidad (CP) o cocientes de verosimilitudes, en inglés, "likelihood ratios" (LR). Los CP positivo y negativo permiten tomar una decisión clínica^{179,184}. La ventaja de esta aproximación es que los valores de CP son independientes de la prevalencia de la condición que se estudia. Los valores de CP tienen una gran utilidad clínica^{184,185}. Si se conoce la probabilidad pre- prueba que tiene un determinado individuo de tener una provocación oral positiva, según el resultado de la prueba, se puede obtener la probabilidad post- prueba mediante un nomograma, que se construye al aplicar el teorema de Bayes¹⁸⁶. Como guía aproximada del valor informativo de los CP tanto positivos como negativos se puede utilizar la tabla de Jaeschke¹⁷⁹ (Tabla 10).

En los últimos años se han publicado estudios de evaluación de pruebas de diagnóstico en la alergia alimentos que han permitido establecer puntos de decisión de diagnóstico (puntos de corte), que se definen como el valor de una determinada prueba de diagnóstico (prueba cutánea y determinación de IgE específica) que ofrece los mejores índices para predecir el resultado de la provocación oral. En general, en la literatura se han utilizado los valores predictivos, en particular el VPP como el índice más adecuado para establecer los puntos de corte, en este sentido se han considerado adecuados aquellos valores que presentan un VPP del 95% o mayor^{106,187}. Sin embargo, los valores predictivos, que son proporciones interesantes para la práctica clínica en un determinado grupo de pacientes, tienen un valor muy limitado porque dependen de la prevalencia de la enfermedad en ese grupo y por lo tanto no es el índice idóneo para la selección de los puntos de corte¹⁸⁵. Lo que importa para interpretar una prueba de diagnóstico no es la prevalencia como tal, sino la denominada probabilidad preprueba, es decir la probabilidad de que un individuo tenga la enfermedad antes de aplicar la prueba.

Los valores que se describen como puntos de corte no pueden aplicarse a una población que sea diferente de la que se ha estudiado. Las características de la población que se va a estudiar son factores decisivos ya que los puntos de corte serán diferentes según la edad, grado de enfermedad, coexistencia de otras enfermedades como dermatitis atópica, tiempo de evolución de la enfermedad, número de provocaciones orales a las que se ha sometido y un largo etcétera. Estos factores van a condicionar la posibilidad de aplicar ese punto de corte a

nuestra población. Es decir, la primera pregunta es cuánto se parece una población a la incluida en el estudio donde se evaluó la prueba. Será factible su utilización en la medida que las poblaciones del estudio y donde se aplicará la prueba sean parecidas¹⁷⁹.

En las tablas 14 y 15 se muestran los puntos de corte y sus índices de exactitud diagnóstica para el diagnóstico de alergia frente a leche. Se describen los valores predictivos originales de los artículos revisados y se han calculado los CP. En aquellos artículos en los que no se tenía la prevalencia de la enfermedad se ha utilizado como tal el porcentaje de provocaciones orales positivas.

Tabla 14. Estudios de rentabilidad diagnóstica las pruebas cutáneas de leche en niños.

Alimento /PC*	edad/ % atopía Nº	Tipo de Reacción	%Reacción positiva	VPP**	CP (+)	Autor/año (cita)
Leche >3mm	<1 años (23%) N=170	Inmediata	42%	60%	1,89	García Ara ⁽⁶⁵⁾ 2001
Leche ≥6mm Leche ≥8mm	<2 años ≥2 años N=310	Inmediata/ tardía	42%	100%	13,2	Sporick ⁽⁶⁴⁾ 2000

*Valor de la Prueba Cutánea (PC) considerado como punto de corte.

** Se dan los VPP originales con una confianza del 95% y se calculan los CP (+).
Nº: número de pacientes

Tabla 15. Estudios de rentabilidad diagnóstica de los niveles de IgE específica frente a la leche en niños.

Autor (cita)	Sampson ¹⁸⁷	Celki-Bilgili ¹¹⁸	García-Ara ¹¹⁶
Tipo de estudio	Prospectivo	Retrospectivo	Prospectivo
Tipo de reacción	Inmediata/Tardía	Inmediata/tardía	Inmediata
Nº pacientes	100	501	170
Edad media (rango)	3,8 (0,4-14,3) a	13m (1m-16 a)	4,8m (1-12) m
% atopia	61%	88%	23%
Tipo de PO	Placebo/simple o doble ciego Abierto	Placebo/simple o doble ciego	Abierta
Nº PO, % (+)	62, 67%		160,42%
Puntos de corte* Leche	15 (kU _A /l)	398, 49%	2,5 (kU _A /l)
CP (+) CP (-)	9,5 0,45	No calculado	9,6 0,54

Edad: m=meses, a=años, PO= Provocación Oral,

% (+)= % de provocaciones positivas (prevalencia de alergia en el estudio)

*VPP(90-95%), CP= cociente de probabilidades

Otros autores han establecido otros puntos de corte para la leche en diversas poblaciones.

Llama la atención la variabilidad de los diversos puntos de corte que son muy dispares. Esta variabilidad está originada por varios motivos que se exponen a continuación:

La edad, la prevalencia de dermatitis atópica y el porcentaje de reacciones inmediatas son variables muy importantes en los estudios realizados. En niños con alergia a la leche y al huevo se observan menores puntos de corte para IgE específica cuando se estudian poblaciones de menor edad y sin dermatitis atópica^{106,117,187,188}, pero esta situación no se confirma en todos los estudio. En algunos estudios se incluyen pacientes con reacciones tardías, cuya relación con la sensibilización IgE es desconocida. En la mayoría de los casos las reacciones tardías son exacerbaciones de la dermatitis atópica^{106,187,188}. La evolución a la tolerancia de la alergia a estos alimentos en la infancia, hace que sea necesaria la definición

“a priori” de la finalidad de esos puntos de corte, si es para establecer el diagnóstico o para definir tolerancia en un determinado momento de la evolución de la enfermedad. En algunos de los estudios realizados no se diferencia en qué situación están los pacientes que se incluyen en la muestra.

Otro factor que interviene es la precisión de la propia prueba que se utiliza. Tanto la prueba cutánea como la determinación de IgE específica son técnicas validadas y estandarizadas, pero la utilización de extractos de alta calidad es fundamental. También es muy importante cómo se realiza la prueba considerada patrón oro, en este caso la provocación oral.

Las diferencias en la metodología empleada, la heterogeneidad en los criterios de inclusión de la población a estudio y la falta de definición de la reacción clínica a evaluar, hacen que la utilización de los puntos de corte no pueda ser utilizados de forma generalizada para predecir la reactividad clínica en el diagnóstico de la alergia mediada por IgE.

En el seguimiento de los pacientes infantiles alérgicos a la leche se ha encontrado una relación entre los niveles de IgE específica al alimento y el desarrollo de tolerancia al mismo^{116,121,189}. Por lo tanto, se puede considerar de utilidad la monitorización de los niveles de IgE específica a lo largo del tiempo, para determinar la oportunidad o no de realizar una nueva provocación oral. En esta situación hay que tener en cuenta los mismos factores antes comentados; clínica, presencia de dermatitis atópica, etcétera en la selección de los pacientes y además la edad debe considerarse como un factor pronóstico muy importante. En la tabla 16 se resumen los estudios de seguimiento de los valores de IgE específica en la infancia para diversos alimentos. En otros estudios con un diseño prospectivo, la magnitud del descenso de los niveles de IgE específica frente a la leche han sido útiles para predecir la tolerancia a ese alimento¹²¹.

Tabla 16. Puntos de decisión propuestos para el seguimiento de niños alérgicos a la leche

Seguimiento mediana	Valor de IgE específica	Prevalencia	Indice	Autor (cita)
33 m	13-18 m 2,7 kU _A /l	77%	CP (+) 10,85 VPP 92%	Garcia-Ara ¹¹⁹
	19-24 m 9 kU _A /l	88%	CP (+) 5,9 VPP 91%	
	25-36 m 24 kU _A /l	56%	CP (+) 6 VPP 90%	
	4 años 2 kU _A /l	31%	CP (+) 5,4 VPP 71%	Vanto ¹⁹⁰

En el presente estudio se revisan un total de 162 niños que acuden a consulta tras haber permanecido durante 6 meses en dieta de exclusión de leche. A todos ellos se les determina el valor de IgE específica en suero y únicamente algo más de la mitad de los pacientes (52.5%) tienen un valor por debajo de 2.5 KU/l y por lo tanto se indica la realización de una provocación oral con leche de continuación. Es posible, por lo tanto, confirmar el estatus de tolerancia en sólo la mitad de los pacientes que se revisan. Los pacientes que presentan niveles por encima de ese punto se mantienen en dieta hasta la siguiente revisión con las implicaciones que conlleva. Los padres han de mantener una estricta vigilancia de todos los productos que el paciente consume, leer los etiquetados que muchas veces no se muestran con la suficiente claridad, además del miedo ante una posible reacción. Esta situación empeora cuando el paciente crece y comienza a socializarse, es invitado a fiestas, cumpleaños o a casa de amigos y familiares.

De los pacientes provocados un 36% presenta una reacción durante la prueba de tolerancia. La clínica más frecuente ha sido la cutánea, que aparece en algo más del 80% de los pacientes. Seguida de las manifestaciones digestivas en alrededor del 30 de los pacientes y respiratorias en el 12%. Hallazgo similar a estudios previos. Esta población es similar en características clínicas a la del estudio de García-Ara¹¹⁹. Aproximadamente la mitad de los pacientes estaban diagnosticados de dermatitis atópica, casi un 30% presentaba pruebas cutáneas positivas frente a alérgenos del huevo y un 10% estaban diagnosticados de alergia a proteínas de

huevo. El 21% estaba diagnosticado de asma. Estas patologías se distribuyeron de forma similar en ambos grupos, su presencia o ausencia no es de utilidad a la hora de tomar la decisión de provocar al paciente.

En cuanto a las pruebas de diagnóstico, la mediana de las pruebas cutáneas en esta población de pacientes roza la positividad, con una distribución muy variable. Los valores de pruebas cutáneas hallados en otros estudios son mayores, alrededor de 7-8 mm para todos los alérgenos. Esto se puede deber a que estos niños son más pequeños, entre 12 y 18 meses y también a que el porcentaje de dermatitis atópica es menor. Lo mismo ocurre con las determinaciones de IgE específica, tanto para leche como para fracciones. La mediana de la IgE de leche es 1 KU/l. Las diferencias en las pruebas de diagnóstico disponibles para distinguir entre tolerantes y reactivos muestran, al igual que en los trabajos previos, importantes limitaciones. Tanto la determinación de IgE específica como la prueba cutánea. No se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de IgE específica frente a leche ni frente a ninguna de las fracciones entre los pacientes que presentaron una provocación positiva y aquellos que toleraron la leche. Por su parte las pruebas cutáneas parece que permitirían discernir mejor entre tolerantes y reactivos, en concreto las pruebas cutáneas de leche y caseína. Hay que tener en cuenta sin embargo, que los puntos óptimos de decisión para ambas son 3 mm, límite de positividad de las pruebas. En resumen, la única diferencia entre estos dos grupos de pacientes es el resultado de la provocación oral. No disponemos en la práctica rutinaria de ningún dato clínico ni analítico que nos permita identificar correctamente, ‘*a priori*’ quien ha superado su alergia de los que no y evitar el riesgo que supondría para estos últimos una provocación positiva.

Hay que tener en cuenta que, al igual que las pruebas fallan a la hora de identificar pacientes que han superado su alergia, en el grupo de pacientes con IgE alta (por encima de 2.5 KU/l) puede existir también un grupo de pacientes que ya hayan evolucionado hacia la tolerancia pero que no se provocan.

En la actualidad los puntos de corte propuestos pueden darnos una orientación pero distan de tener un buen rendimiento en el diagnóstico de la alergia mediada por IgE y por tanto su ayuda en la toma de decisión con respecto a la provocación oral aún es limitada¹¹¹. En este contexto, surge por ello la necesidad de buscar nuevas técnicas de diagnóstico. Una mejor caracterización de los alérgenos mediante técnicas de biología molecular y de la respuesta inflamatoria alérgica mediante la descripción de epítomos de células B parece fundamental en este objetivo. Surge la necesidad de buscar nuevas aproximaciones que permitan mejorar el diagnóstico. En el año 2005, aparece la posibilidad de continuar esta línea de investigación en el diagnóstico de alergia a proteínas de leche de vaca en colaboración con el grupo de investigación en alergia a alimentos ('Jaffe Food Allergy Institute') de Mount Sinai, NY. Para llevar a cabo esta nueva fase, se reclutaron pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca siguiendo los mismos criterios de inclusión y exclusión con niveles de IgE por debajo de 2.5 KU/l y que por lo tanto fueron provocados siguiendo la misma metodología. Se trata por lo tanto de una población de pacientes clínicamente superponible a la anterior con valores serológicos similares.

6.2 APLICACIÓN DE LOS MICROARRAYS DE PÉPTIDOS AL MANEJO DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA.

Los microarray de DNA llevan varios años utilizándose a nivel de investigación, e incluso tiene su aplicación a nivel asistencial en la actualidad en el campo de la oncología. La experiencia en la aplicación de esta técnica al estudio de proteínas, es reciente y escasa, y limitado al campo de la investigación. Una ventaja a priori de esta técnica, comparada con las técnicas para diagnóstico 'in vitro' de las que disponemos en alergia en la actualidad, es que permite el estudio de miles de dianas en paralelo usando pequeñas cantidades de suero del paciente. Sin embargo, la gran aportación de la técnica de microarray de péptidos es permitir una nueva aproximación al estudio de los epítomos lineales. Los primeros ensayos microarray de péptidos se desarrollaron para el estudio de la respuesta inmune frente a virus. Se ha estudiado la evolución de la respuesta de células B frente a epítomos lineales de antígenos virales antes y después de la administración de una vacuna. Estos trabajos han permitido por un lado,

monitorizar en los ensayos clínicos la respuesta frente a la vacunación, y por otro lado encontrar regiones inmunodominantes susceptibles de ser diana terapéutica, mejorando así la eficacia del tratamiento^{136,137,191}.

En el caso de la alergia a alimentos, en concreto a proteínas de leche de vaca, se han realizado estudios de cartografía de los epítomos de las cuatro caseínas a los que se une la IgE específica de los pacientes alérgicos. En ellos se han identificado un número de epítomos secuenciales denominados epítomos informativos que son reconocidos por la IgE de los niños que van a permanecer como alérgicos a lo largo del tiempo. Este hecho no ocurre en los que desarrollan tolerancia de forma temprana¹⁹²⁻¹⁹⁴. Estos resultados han permitido establecer un paralelismo entre el reconocimiento de determinadas zonas en la secuencia lineal de la proteína y patrones clínicos de peor pronóstico, pacientes con alergia persistente y que por tanto se beneficiarían de un tratamiento de desensibilización.

En este sentido, la tecnología microarray ha comenzado a mostrar su posible utilidad. En pacientes alérgicos a cacahuete se ha encontrado que el reconocimiento de determinados epítomos se asocia con la tolerancia o alergia confirmada mediante PODCCP¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

El presente estudio se ha centrado en la especificidad y la diversidad de la respuesta IgE frente a alérgenos y su posible utilidad en el diagnóstico de los pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca, en concreto para predecir el momento en que se alcanza la tolerancia al alimento. Los estudios previos han buscado caracterizar poblaciones homogéneas de pacientes con alergia persistente en comparación con pacientes con alergia transitoria ya superada y controles sanos. Como se ha expuesto en la sección de introducción, la alergia a alimentos está mediada por anticuerpos de la clase IgE dirigidos frente a epítomos alérgicos. La unión puede ser frente a epítomos lineales o conformacionales y ambos pueden desencadenar una respuesta inflamatoria alérgica. Los pacientes con anticuerpos IgE dirigidos frente a epítomos secuenciales, demostrado por la unión a péptidos sintéticos que cubren la secuencia lineal de la proteína, se ha visto que tienen una forma de alergia mas grave y persistente. Los datos referentes a la importancia de estos epítomos lineales han sido

generados mediante ensayos con membranas SPOT (Genosys Biotechnologies, Woodlands, Tex, USA). Pero la caracterización del perfil antigénico de pacientes individuales por este método tiene importantes desventajas. La síntesis de un gran número de péptidos es costosa en términos de tiempo, dinero y cantidad de suero necesaria para el ensayo, sin olvidar que se pueden testar un número limitado de pacientes.

La escasa cantidad de suero necesaria para los ensayos microarray es de suma importancia en una patología como la alergia a las proteínas de leche de vaca que afecta mayoritariamente a niños en las primeras edades de la vida en que la obtención del volumen necesario de suero para los estudios disponibles en la práctica clínica rutinaria es en ocasiones difícil.

En la serie que se presenta en la tesis, de los 31 pacientes incluidos, 16 tuvieron una provocación positiva y por lo tanto fueron considerados reactivos, es decir pacientes que aún no habían superado su alergia a alimentos. El resto de pacientes no presentó ningún síntoma con la reintroducción de la leche y por lo tanto se consideró que habían superado su alergia a la leche. No hubo diferencias clínicamente significativas en los valores de IgE total entre ambos grupos. En cuanto a los niveles de IgE específica, la mediana fue de 2.1 KU/l en los niños tolerantes y de 1.9 KU/l en el grupo reactivo. No mostraron tampoco diferencias en cuanto a los síntomas con la ingesta de leche al diagnóstico. Por lo tanto estamos ante una población de pacientes clínica y analíticamente similares, es decir, pacientes con niveles bajos de IgE que presumiblemente van a superar espontáneamente su alergia a la leche, pero con evolución hacia la tolerancia distinta.

En este estudio se evaluaron α s1-, α s2-, β - y κ -caseínas, y β -lactoglobulina con el fin de identificar zonas de unión de anticuerpos de las clases IgE e IgG4 en una población de pacientes. No se ha incluido en el análisis la α -lactoalbúmina por no haberse demostrado la existencia de epítomos lineales informativos en estudios previos.

En un primer abordaje de los datos extraídos del ensayo se exploró el número global de péptidos reconocidos por cada grupo de pacientes y se ha visto que el número de epítomos reconocido por los anticuerpos de la clase IgE es mayor en el grupo reactivo que en el tolerante

(3.32% frente al 0.08%). Este hallazgo es concordante con los estudios previos de muestreo de alérgenos de cacahuete, en los que se observa que los pacientes con reactividad clínica y peor pronóstico reconocían un mayor número de epítomos lineales.

En un segundo paso se buscaron aquellos epítomos reconocidos mayoritariamente por los pacientes. Se consideraron como epítomos aquellas regiones reconocidas por al menos el 75% de los pacientes. Dado el riesgo de obtener resultados falsos positivos, es decir describir zonas que no son verdaderamente epítomos decidimos adoptar un criterio más estricto del empleado en publicaciones previas donde se define como epítomo dominante aquel reconocido por el 50% de los pacientes estudiados. En un último estadio con el objetivo de identificar aquellas zonas que permitan distinguir entre pacientes reactivos y tolerantes se han identificado 10 regiones con reconocimiento significativamente distinto a lo largo de las 5 proteínas estudiadas. Estos epítomos son: α s1 caseína: AA 28-50, α s2: AA 1-20, 13-32, 67-86 y 181-207. β -caseína: AA 25-50, 52-74 y 154-173. β -lactoglobulina: AA 58-77 y κ -caseína: AA 34-53

En la figura 31 se muestran los epítomos identificados en este trabajo (sombreado) en comparación con aquellos propuestos en trabajos previos (subrayados).

Figura 31. Epítomos identificados en las secuencias lineales de los alérgenos estudiados y epítomos descritos previamente.

α -s1 caseína

10	20	30	40	50
RPKHPIKHQGLPQEV	<u>NENLLRFFVAP</u>	<u>FPEVFGKEKVNEL</u>	<u>SKDIGSESTE</u>	
60	70	80	90	100
DQAMEDIKQMEAE	<u>SSSEEIVPNSVEQ</u>	<u>KHIQKEDVPSERY</u>	<u>LGYLEQLLR</u>	
110	120	130	140	150
<u>LKKYKVPQLEIV</u>	<u>NSAEERLHSMKE</u>	<u>GIHAQQKEPMI</u>	<u>GVNOELAYFY</u>	<u>PELF</u>
160	170	180	190	199
<u>RQFYQLDAYPS</u>	<u>GAWYYVPLGTQ</u>	<u>YTDAPSFSDI</u>	<u>PNPIGSENSEK</u>	<u>TTMPLW</u>

α -s2 caseína

```

      10      20      30      40      50
KNTMEHVSSSEESIISQETYSQEKNNMAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEE
      60      70      80      90     100
EYSIGSSSEESAEVATEEVKITVDDKHYSQKALNEINQFYQKFPQYLOYLY
      110     120     130     140     150
QGPIVLNPDQVKNRNPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKK
      160     170     180     190     200
TKLTEEEKNRLNFKKISORYQKQFALPOYLKTVYQHOKAM KPWIQPKTKV
      207
IPYVRYL

```

 β caseína

```

      10      20      30      40      50
RELEELNVGEIVESLSSEESITRINKKIEKFQSEEQQQTDELQDKIH
      60      70      80      90     100
PFAQTQSLVYFFGPIPNLIPONTIPPLTQTPVVVPPFLOPEVMGVSKVKE
      110     120     130     140     150
AMAPKHKEMPFPKYPVEPFTESSQLTITDVENLHLPLPLQSWMHQPHQP
      160     170     180     190     200
LPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQDMPDQAFLLYQEPVLGP
      210
VRGPFPIIV

```

 κ caseína

```

      10      20      30      40      50
QEQNQEQPIRCEKDERFFSDKIAKYIPIQYVLSRYPSYGLNYYQOKPVAL
      60      70      80      90     100
INNQFLPYPYAKPAAVRSPAQILQWQVLSNTVPAKSCQAQPTTMARHPH
      110     120     130     140     150
PHLSFMAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSP
      160     169
EVIESPPEINTVQVTSTAV

```

 β lactoglobulina

```

      10      20      30      40      50
LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTP
      60      70      80      90     100
EGDLEILLOKWEDECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYK
      110     120     130     140     150
KYLFLCMENSAEPEQSLVCQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLS
      160
FNPTQLEEQCHI

```

Si se analiza cada proteína individualmente, α s1-caseína es una fosfoproteína de cadena simple con una longitud de 199 AA y estudios previos habían mostrado la relevancia de esta proteína identificando en ella un número importante de epítomos. En el presente trabajo se ha

encontrado una región que fue reconocida mayoritariamente por el grupo reactivo (AAs 28-50) si se compara con el grupo de pacientes que había superado la alergia a proteínas de leche de vaca. Chatchatee¹⁹⁸ identificó dos epítomos en esta región y en concreto AAs 17-36 fue asociado a los pacientes de mayor edad, es decir aquellos considerados alérgicos persistentes, los pacientes con una alergia a proteínas de leche más grave. Esa zona fue igualmente identificada por Spuergin¹⁹⁹ y Elsayed²⁰⁰, los cuales identificaron también otro epítomo minoritario, AAs 39-48. En el trabajo de Elsayed, la zona más reconocida fue AAs 173-194, ya que el 100% de los pacientes alérgicos persistentes reaccionaron frente a ella. Nakajima-Adachi²⁰¹ describió en su trabajo esa misma zona. Por lo tanto, este extremo carboxiterminal ha sido propuesto como predictor de alergia persistente. Este patrón distinto de reconocimiento con respecto al encontrado en presente trabajo puede ser debido al hecho de que los pacientes aquí incluidos son mas pequeños (mediana de edad de 2 años) que los incluidos en otros estudios. Por otro lado, el perfil clínico es considerablemente distinto. Se trata de niños con niveles de IgE bajos (inferior a 2.5KU/l) que presumiblemente la mayoría de ellos superarán su alergia a pesar de su situación actual de reactividad clínica. Por el contrario, los niños estudiados por otros grupos, tienen un patrón clínico mas grave, con niveles de IgE muy altos, es decir, pacientes que en la mayoría de los casos no van a superar su alergia espontáneamente. Los pacientes incluidos por Spuergin tenían una edad comparable a la de este estudio, todos ellos menores de 3 años y no encontró tampoco reconocimiento en esta zona.

En α s2-caseína, proteína compuesta por 207 AAs, se encontraron cuatro regiones asociadas al grupo reactivo. Si se compara con el estudio de Busse²⁰², únicamente una región de 8 AAs (182-189) es similar. Sin embargo, al igual que ocurre con la anterior proteína, α s1-caseína, la población estudiada es muy distinta, por lo tanto no es posible establecer comparaciones directas (todos los pacientes incluidos por Busse en su estudio tenían un valor de IgE por encima de 100 KU/l).

La β -caseína está formada por 209 AAs y aunque tiene muy poca homología con α s1-caseína, las dos proteínas tienen una estructura similar. Comparando los resultados expuestos en esta

tesis con los previamente publicados por Chatchatee²⁰³, hay una zona común reconocida en ambos estudios que corresponde con los AAs 181-189.

κ -caseína es una proteína de 169 AAs que fue estudiada previamente por Chatchatee²⁰³ conjuntamente con La β -caseína. Se describe hay un área común en ambos estudios entre los AAs 34-53.

La β -lactoglobulina tiene una conformación nativa en forma de dímero y cada subunidad está formada por 162 AAs. Esta proteína no tiene una proteína homóloga presente en la leche materna. Se han descrito epítomos en varios estudios previos que se han centrado en pacientes con alergia persistente, incluyendo en uno de ellos un conjunto de sueros de pacientes con IgE baja con el que se establece una comparación. En el estudio de Jarvinen²⁰⁴ no se describen epítomos similares al expuesto en esta tesis. Esto se puede deber a la pérdida de sensibilidad de este tipo de ensayos en que se emplean conjuntamente sueros de distintos pacientes en lugar de sueros individuales.

Para finalizar esta discusión, es importante reflexionar sobre las limitaciones y las fortalezas de este trabajo, así como las posibles implicaciones para la práctica clínica y para la investigación. Dentro de las limitaciones del estudio hay que tener en cuenta que se ha explorado un gran número de epítomos mediante pruebas estadísticas con las que hay un problema de inflación del error tipo I que no ha sido corregido. Esto se podría traducir en el descubrimiento de un número importante de falsos positivos. Por otro lado, el limitado número de pacientes analizados puede dar lugar a falsos negativos. Dado que la potencia estadística está comprometida, se ha sido estricto a la hora de describir un epítomo, únicamente considerando aquellos reconocidos por al menos el 75% de los pacientes reactivos.

La población seleccionada para este estudio fue seguida de acuerdo a la práctica clínica habitual y por lo tanto la indicación de la provocación oral fue guiada por los niveles de IgE medidos mediante CAP System FEIA. Es importante recalcar que la muestra incluida en este estudio tiene una gran homogeneidad. Todos los pacientes fueron provocados y no se han

encontrado diferencias significativas en cuanto a la edad, sexo, síntomas o los niveles de IgE específica entre los pacientes reactivos y tolerantes.

Se ha adoptado un criterio muy estricto de identificación de epítomos: se han buscado aquellas zonas con un ratio IgE/IgG4 por encima de 1 y que eran reconocidas por al menos el 75% de los pacientes. Este criterio confiere una gran especificidad al estudio, pero indudablemente hay una pérdida de sensibilidad con el riesgo de no identificar algunas regiones. Esto puede, en parte explicar el pequeño número de epítomos identificados en nuestro estudio si comparamos con estudios previos. Es necesario tener también en cuenta que el limitado número de pacientes, a limitar la potencia estadística, puede explicar parte de esta diferencia

Estos resultados son prometedores. Aunque se trata de un estudio preliminar cuyos resultados se han de validar en una cohorte independiente de pacientes. Su aplicación en la práctica clínica habitual es factible. Al igual que se está disponible comercialmente un 'chip' conteniendo un panel de proteínas alergénicas recombinantes para la caracterización de pacientes alérgicos a pólenes y vegetales, una vez confirmado este hallazgo de epítomos asociados a reactividad clínica, se puede igualmente producir un 'chip' conteniendo alergenos de leche u otros alimentos. Esto mejoraría el diagnóstico de los niños alérgicos, disminuyendo el riesgo de una provocacion innecesarias.

6.3 PLANES FUTUROS.

De acuerdo a la clasificación de Sackett de diseños de evaluación de pruebas diagnósticas²⁰⁵, este estudio se puede encardinar en una fase II de evaluación de pruebas diagnósticas. La fase I, abordada en estudios previos establece que el test evaluado (en este caso el reconocimiento de determinadas secuencias en la secuencia lineal de los alergenos) permite diferenciar entre pacientes e individuos sanos. Por lo tanto, en vista de estos resultados, se ha decidido afrontar esta nueva fase con el objetivo de establecer si en un grupo de pacientes clínicamente similares pero con resultado distinto en la provocación oral reconocen de forma diferencial regiones de la secuencia primaria de las proteínas estudiadas. Los resultados de

esta fase se deberían validar en una fase posterior, fase III de evaluación, en la que en un diseño adecuado (serie consecutiva de pacientes alérgicos en seguimiento) se evalúa el papel que tendrían en la clínica estos marcadores. Esta fase que vendría seguida de la evaluación del impacto real del uso de estas pruebas así como una evaluación de coste-efectividad (fase IV descrita por Sackett)²⁰⁶.

El grupo de investigación en alergia a alimentos que ha llevado a cabo este proyecto tiene la firme intención de continuar con esta línea de investigación con el objetivo de abordar el estudio de esta patología en todos los estadios de su evolución clínica y con una aplicación no sólo diagnóstica sino también terapéutica. El grupo ha recibido financiación recientemente mediante un proyecto FIS en la convocatoria de 2008. Este nuevo proyecto, tiene dos objetivos principales y complementarios. En primer lugar, analizar en una población amplia de pacientes alérgicos a la leche (> 200) el curso natural del reconocimiento de epítomos y su asociación con el desarrollo de un fenotipo de alergia persistente. Esto se realizaría mediante el seguimiento prospectivo de una cohorte de alérgicos a la leche y reclutados en el primer año del proyecto en 4 hospitales. Por otro lado, se intentará valorar el efecto en la modulación de la respuesta inmunológica de un tratamiento activo que consiste en la inducción de tolerancia al alimento mediante la administración de dosis progresivas del mismo (desensibilización). Mediante la inducción de tolerancia oral o desensibilización se produce una modulación de la respuesta inmunológica pasando de la reactividad clínica a la tolerancia, y se supone que esto conlleva una modificación del reconocimiento epitópico en los alérgenos de la leche. Para estudiarlo se analizarán los pacientes desensibilizados, lo que nos permitirá establecer nuevos marcadores séricos que permitan predecir y monitorizar la respuesta al tratamiento. La combinación de los datos de las dos poblaciones nos permitirá establecer qué pacientes son los candidatos ideales para entrar en un protocolo de inducción de tolerancia oral, y cuál es el momento idóneo para hacerlo. Adicionalmente, este proyecto nos permitirá identificar cómo se modifica el reconocimiento de determinadas zonas alergénicas que serían susceptibles de ser diana terapéutica en futuras actuaciones para desarrollar tratamientos mediante inmunoterapia específicamente dirigida frente a esas regiones, y por lo tanto una inmunoterapia eficaz.



Capítulo 7

CONCLUSIONES

1. El seguimiento habitual de los niños alérgicos a leche mediante la determinación de IgE específica y el punto de corte establecido de 2.5 KU/l es poco discriminante en la predicción de tolerancia clínica, encontrando un 36% de provocaciones orales positivas.
2. En pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca que van a ser provocados, las variables clínicas estudiadas edad, sexo, clínica de la primera reacción, dermatitis atópica, alergia a otros alimentos, no ayudan a predecir el resultado de la provocación.
3. El rendimiento de las pruebas cutáneas con leche de vaca y fracciones, en la población de niños alérgicos en seguimiento con criterio de provocación es discreto para predecir la tolerancia.
4. Los pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca reconocen epítopos lineales en los alérgenos estudiados (caseínas y betalactoglobulina), identificados mediante microarrays de péptidos.
5. Existen diferentes patrones de reconocimiento IgE de epítopos que se asocian a diferentes perfiles clínicos.
6. Los microarrays de péptidos pueden ser útiles en el manejo diagnóstico de los niños alérgicos a proteínas de leche de vaca.



Capítulo 8

SUMMARY

BACKGROUND

Cow's milk allergy (CMA) is a common and often transitory disease affecting approximately 2.5% of children less than 2 years of age. The mainstay of treating milk allergy consists of prescribing a milk-free diet and having the patient return for regular follow-up visits to re-evaluate the status of their allergy. The majority of children with IgE-mediated milk allergy become tolerant. At the outset, the difficulty lies in predicting which children may develop severe allergic reactions to milk and which will remain allergic for a lifetime. Different cutoff values for skin prick test (SPT) and specific IgE antibodies levels have been previously given to predict the result of the food challenge test, in cows' milk allergic children. Peptide microarray analysis is one method that may provide useful information on the nature of specific allergies

OBJETIVE

The aims of this study is evaluate the accuracy of previously proposed cut-off values in our population of allergic patients and to determine the IgG4 and IgE specificity and diversity to sequential epitopes of α s1-, α s2-, β -, and κ -caseins, and β -lactoglobulin using a peptide microarray-based immunoassay.

METHODS

A transversal study which included children 0 to 14 years old referred to the Allergy Clinic of Ramón y Cajal Hospital and diagnosed cows' milk allergy: history of allergic reaction after ingestion of milk and positive SPT and/or positive specific IgE antibodies determination. After six months of milk-free diet, a complete anamnesis, SPT with cow's milk, alfa lactoalbumin, betalactoglobuline and casein, specific IgE antibodies were determined for the same allergens. Simplified-blind controlled food challenges (SBCFC) with previous authorization of the parents were performed in those children with specific IgE antibodies determination lower than 2.5 KU/l.

In a posterior step, a microarray immunoassay was performed using sera from 31 IgE-mediated milk allergic children (16 positive to oral milk challenge, "reactive group", and 15 negative, "tolerant group"). A library of peptides, consisting of 20 amino acids overlapping by 17 (3-offset), corresponding to the primary sequences of α s1-, α s2-, β -, and κ -caseins, and β -lactoglobulin was printed on epoxy-coated slides. A region was defined as an epitope if it was statistically associated with reactive groups and recognized by at least 75% of reactive patients.

RESULTS

162 children were included in the study. Only 85 children had specific IgE lower than 2.5KU/l and an oral challenge (SBCFC) were performed. 54 tolerate (63.5%).

Best cutoff points for SPT to milk and fractions were 3mm.

Mapping milk allergens utilizing a peptide microarray assay, a total of 10 epitopes were identified:

- Alpha s1: AA 28-50 reactive 75%, tolerant 26.7% ($p=0.012$).
- Alpha s2: AA 1-20 reactive 75%, tolerant 13.3% ($p=0.001$); AA 13-32 reactive 75%, tolerant 26.7% ($p=0.012$), AA 67-86 reactive 75% tolerant 33.3% ($p=0.032$) and AA 181-207 reactive 75% tolerant 20% ($p=0.004$).
- Beta-casein: AA 25-50 reactive 75% tolerant 33.3% ($p=0.032$), AA 52-74 reactive 81.3% tolerant 26.7% ($p=0.004$) and AA 154-173 reactive 75% tolerant 33.3% ($p=0.032$).
- Beta-lactoglobulin: AA 58-77 reactive 81.3% tolerant 40% ($p=0.029$).
- Kappa-casein: AA 34-53 reactive 87.5% tolerant 40% ($p=0.009$).

CONCLUSION

Available diagnostic test in daily practice have limited utility in predicting the result of the oral challenge.

Several regions have been defined as epitopes, showing a differential recognition pattern between reactive and tolerant patients. Further studies are needed to validate the utility of this assay in clinical practice.



Capítulo 9

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Crespo JF, Pascual C, Burks AW, Helm RM, Esteban MM. Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatr Allergy Immunol*. 1995;6:39-43.
- (2) Marguet C, Couderc L, Blanc T et al. [Anaphylaxis in children and adolescents: apropos of 44 patients aged 2 months to 15 years]. *Arch Pediatr*. 1999;6 Suppl 1:72S-78S.
- (3) Weiler JM. Anaphylaxis in the general population: A frequent and occasionally fatal disorder that is underrecognized. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:271-273.
- (4) ESPGAN committee on nutrition. **Guidelines on infant nutrition. II. Recommendations for the composition of follow-up formula and Beikost.** *Acta Paediatr Scand Suppl*. 1981;287:1-25.
- (5) American Academy of Pediatrics: Nutrition in infancy and childhood. In: American Academy of Pediatrics Pub.Department, ed. *Pediatric nutrition handbook*. Illinois.: 1985.
- (6) Peña Quintana L. Alimentación del preescolar y escolar. In: Moraga F, ed. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría*. 2002.
- (7) www.msc.es/ciudadanos/proteccionSalud/infancia/alimentacion/tema3.htm. Diseño y planificación de dietas saludables. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2008.
Ref Type: Electronic Citation
- (8) Kunz C, Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clin Perinatol*. 1999;26:307-333.

-
- (9) Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, Kunz C, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk: II. Lipids, micronutrients, and bioactive factors. *Clin Perinatol*. 1999;26:335-359.
- (10) Chase MW. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. *Proc Soc Exp Biol*. 1946;257-259.
- (11) Barone KS, Reilly MR, Flanagan MP, Michael JG. Abrogation of oral tolerance by feeding encapsulated antigen. *Cell Immunol*. 2000;199:65-72.
- (12) Michael JG. The role of digestive enzymes in orally induced immune tolerance. *Immunol Invest*. 1989;18:1049-1054.
- (13) Untersmayr E, Scholl I, Swoboda I et al. Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:616-623.
- (14) Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system. *Cell Immunol*. 1981;61:141-153.
- (15) Sicinski P, Rowinski J, Warchol JB et al. Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology*. 1990;98:56-58.
- (16) Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Transepithelial transport and mucosal defence II: secretion of IgA. *Trends Cell Biol*. 1992;2:170-174.
- (17) Shreedhar VK, Kelsall BL, Neutra MR. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. *Infect Immun*. 2003;71:504-509.

-
- (18) Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA. Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol.* 1998;160:5815-5825.
- (19) Bland PW, Warren LG. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells. *Immunology.* 1986;58:9-14.
- (20) Mayer L, Shlien R. Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med.* 1987;166:1471-1483.
- (21) Berin MC, Kiliaan AJ, Yang PC, Groot JA, Kitamura Y, Perdue MH. The influence of mast cells on pathways of transepithelial antigen transport in rat intestine. *J Immunol.* 1998;161:2561-2566.
- (22) Brandt EB, Strait RT, Hershko D et al. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest.* 2003;112:1666-1677.
- (23) Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:206-214.
- (24) McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grecis RK. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:7761-7766.
- (25) Johansson SG, Bieber T, Dahl R et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:832-836.
- (26) Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:805-819.

-
- (27) Osterballe M, Hansen TK, Mortz CG, Host A, Bindslev-Jensen C. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16:567-573.
- (28) Pereira B, Venter C, Grundy J, Clayton CB, Arshad SH, Dean T. Prevalence of sensitization to food allergens, reported adverse reaction to foods, food avoidance, and food hypersensitivity among teenagers. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:884-892.
- (29) Zuberbier T, Edenharter G, Worm M et al. Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study. *Allergy.* 2004;59:338-345.
- (30) Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:1203-1207.
- (31) Pascual CY, Crespo JF, Perez PG, Esteban MM. Food allergy and intolerance in children and adolescents, an update. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54 Suppl 1:S75-S78.
- (32) Penard-Morand C, Raheison C, Kopferschmitt C et al. Prevalence of food allergy and its relationship to asthma and allergic rhinitis in schoolchildren. *Allergy.* 2005;60:1165-1171.
- (33) Rance F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Vautrin DA. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr Allergy Immunol.* 1999;10:33-38.
- (34) Zuberbier T, Edenharter G, Worm M et al. Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study. *Allergy.* 2004;59:338-345.

-
- (35) Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics*. 1987;79:683-688.
- (36) Kulig M, Bergmann R, Klettke U, Wahn V, Tacke U, Wahn U. Natural course of sensitization to food and inhalant allergens during the first 6 years of life. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:1173-1179.
- (37) Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y Alergia e Inmunología. Alergia a alimentos. In: Abelló S.A, ed. *Alergológica. Factores Epidemiológicos, Clínicos y Socioeconómicos de las Enfermedades Alérgicas en España*. Madrid: 1995:163-83.
- (38) Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y Alergia e Inmunología. Alergia a alimentos. *Alergológica 2005. Factores Epidemiológicos, Clínicos y Socioeconómicos de las Enfermedades Alérgicas en España*. Madrid: 2008:163.
- (39) Hill DJ, Firer MA, Ball G, Hosking CS. Natural history of cows' milk allergy in children: immunological outcome over 2 years. *Clin Exp Allergy*. 1993;23:124-131.
- (40) Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy*. 1990;45:587-596.
- (41) Host A, Jacobsen HP, Halken S, Holmenlund D. The natural history of cow's milk protein allergy/intolerance. *Eur J Clin Nutr*. 1995;49 Suppl 1:S13-S18.
- (42) Wal JM. Cow's milk allergens. *Allergy*. 1998;53:1013-1022.
- (43) Wal JM. Structure and function of milk allergens. *Allergy*. 2001;56 Suppl 67:35-38.

-
- (44) Wal JM. Cow's milk proteins/allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002;89:3-10.
- (45) Kumosinski TF, Brown EM, Farrell HM, Jr. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: alpha s1-casein. *J Dairy Sci.* 1991;74:2889-2895.
- (46) Kumosinski TF, Brown EM, Farrell HM, Jr. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: kappa-casein. *J Dairy Sci.* 1991;74:2879-2887.
- (47) Adams JJ, Anderson BF, Norris GE, Creamer LK, Jameson GB. Structure of bovine beta-lactoglobulin (variant A) at very low ionic strength. *J Struct Biol.* 2006;154:246-254.
- (48) Creamer LK, Parry DA, Malcolm GN. Secondary structure of bovine beta-lactoglobulin B. *Arch Biochem Biophys.* 1983;227:98-105.
- (49) Burks W. Skin manifestations of food allergy. *Pediatrics.* 2003;111:1617-1624.
- (50) Rance F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Vautrin DA. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr Allergy Immunol.* 1999;10:33-38.
- (51) Wuthrich B. Food-induced cutaneous adverse reactions. *Allergy.* 1998;53:131-135.
- (52) Amin S, Tanglertsampan C, Maibach HI. Contact urticaria syndrome: 1997. *Am J Contact Dermat.* 1997;8:15-19.
- (53) Burks AW, Mallory SB, Williams LW, Shirrell MA. Atopic dermatitis: clinical relevance of food hypersensitivity reactions. *J Pediatr.* 1988;113:447-451.
- (54) Sampson HA. Jerome Glaser lectureship. The role of food allergy and mediator release in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;81:635-645.

- (55) Champion RH, Roberts SO, Carpenter RG, Roger JH. Urticaria and angio-oedema. A review of 554 patients. *Br J Dermatol*. 1969;81:588-597.
- (56) Kushimoto H, Aoki T. Masked type I wheat allergy. Relation to exercise-induced anaphylaxis. *Arch Dermatol*. 1985;121:355-360.
- (57) Monroe EW, Jones HE. Urticaria. An updated review. *Arch Dermatol*. 1977;113:80-90.
- (58) Nizami RM, Baboo MT. Office management of patients with urticaria: an analysis of 215 patients. *Ann Allergy*. 1974;33:78-85.
- (59) Sehgal VN, Rege VL. An interrogative study of 158 urticaria patients. *Ann Allergy*. 1973;31:279-283.
- (60) Roehr CC, Edenharter G, Reimann S et al. Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1534-1541.
- (61) Atkins FM, Steinberg SS, Metcalfe DD. Evaluation of immediate adverse reactions to foods in adult patients. I. Correlation of demographic, laboratory, and prick skin test data with response to controlled oral food challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;75:348-355.
- (62) Sicherer SH. Clinical aspects of gastrointestinal food allergy in childhood. *Pediatrics*. 2003;111:1609-1616.
- (63) Sampson HA. Food allergy--accurately identifying clinical reactivity. *Allergy*. 2005;60 Suppl 79:19-24.

-
- (64) Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy*. 1988;61:47-52.
- (65) Nekam KL. Nutritional triggers in asthma. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 1998;45:113-117.
- (66) Onorato J, Merland N, Terral C, Michel FB, Bousquet J. Placebo-controlled double-blind food challenge in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1986;78:1139-1146.
- (67) James JM, Bernhisel-Broadbent J, Sampson HA. Respiratory reactions provoked by double-blind food challenges in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149:59-64.
- (68) Businco L, Falconieri P, Giampietro P, Bellioni B. Food allergy and asthma. *Pediatr Pulmonol Suppl*. 1995;11:59-60.
- (69) Oehling A, Baena Cagnani CE. Food allergy and child asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1980;8:7-14.
- (70) Decker WW, Campbell RL, Manivannan V et al. The etiology and incidence of anaphylaxis in Rochester, Minnesota: a report from the Rochester Epidemiology Project. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:1161-1165.
- (71) Lieberman P, Camargo CA, Jr., Bohlke K et al. Epidemiology of anaphylaxis: findings of the American College of Allergy, Asthma and Immunology Epidemiology of Anaphylaxis Working Group. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;97:596-602.
- (72) Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med*. 1992;327:380-384.

-
- (73) Sheikh A, Alves B. Hospital admissions for acute anaphylaxis: time trend study. *BMJ*. 2000;320:1441.
- (74) Simon MR, Mulla ZD. A population-based epidemiologic analysis of deaths from anaphylaxis in Florida. *Allergy*. 2008;63:1077-1083.
- (75) Sicherer SH, Sampson HA. 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:S470-S475.
- (76) Simons FE, Frew AJ, Ansotegui IJ et al. Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:S2-24.
- (77) Lin RY, Anderson AS, Shah SN, Nurruzzaman F. Increasing anaphylaxis hospitalizations in the first 2 decades of life: New York State, 1990 -2006. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;101:387-393.
- (78) Sampson HA, Munoz-Furlong A, Bock SA et al. Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:584-591.
- (79) Eseverri JL, Cozzo M, Castillo M, Marin A. [Round Table: Immunological urticaria mediated by IgE]. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1999;27:104-111.
- (80) Cristaudo A, Simonato B, Pasini G, De RM, Curioni A, Giannattasio M. Contact urticaria and protein contact dermatitis from corn in a patient with serum IgE specific for a salt-soluble corn protein of low molecular weight. *Contact Dermatitis*. 2004;51:84-87.
- (81) Maibach HI, Johnson HL. Contact urticaria syndrome. Contact urticaria to diethyltoluamide (immediate-type hypersensitivity). *Arch Dermatol*. 1975;111:726-730.

-
- (82) Simons FE. Anaphylaxis, killer allergy: long-term management in the community. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:367-377.
- (83) Harwanegg C, Laffer S, Hiller R et al. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:7-13.
- (84) Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol*. 1967;99:1187-1198.
- (85) Lidholm J, Ballmer-Weber BK, Mari A, Vieths S. Component-resolved diagnostics in food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006;6:234-240.
- (86) Harwanegg C, Laffer S, Hiller R et al. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:7-13.
- (87) Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:981-989.
- (88) Sicherer SH, Sampson HA. 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:S470-S475.
- (89) Comité de reacciones adversas a alimentos.SEAIC. Metodología diagnóstica en la alergia a los alimentos (Artículo especial). *Alergol Inmunol Clin*. 2009;14:50-62.
- (90) Steinman HA. "Hidden" allergens in foods. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98:241-250.
- (91) Bjorksten F, Halmeperu L, Hannuksela M, Lahti A. Extraction and properties of apple allergens. *Allergy*. 1980;35:671-677.

-
- (92) Son DY, Scheurer S, Hoffmann A, Haustein D, Vieths S. Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr*. 1999;38:201-215.
- (93) Vieths S, Hoffmann A, Holzhauser T, Muller U, Reindl J, Haustein D. Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis. *Allergy*. 1998;53:65-71.
- (94) Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K et al. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51:135-147.
- (95) Pastorello E. Skin test for the diagnosis of IgE mediated allergy. Position paper: Allergen standarization and skin tests. *Allergy*. 2009;1993:57-62.
- (96) Bock SA, Lee WY, Remigio L, Holst A, May CD. Appraisal of skin tests with food extracts for diagnosis of food hypersensitivity. *Clin Allergy*. 1978;8:559-564.
- (97) Sampson HA, Albergo R. Comparison of results of skin tests, RAST, and double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1984;74:26-33.
- (98) Bock SA, Sampson HA, Atkins FM et al. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;82:986-997.
- (99) Rosen JP, Selcow JE, Mendelson LM, Grodofsky MP, Factor JM, Sampson HA. Skin testing with natural foods in patients suspected of having food allergies: is it a necessity? *J Allergy Clin Immunol*. 1994;93:1068-1070.

-
- (100) Malling HJ. Methods of skin tests. Position paper: Allergen standardization and skin tests. *Allergy* ; . 2009;1993:55-56.
- (101) Ortolani C, Ispano M, Pastorello EA, Ansaloni R, Magri GC. Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 1989;83:683-690.
- (102) Sampson HA. Comparative study of commercial food antigen extracts for the diagnosis of food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;82:718-726.
- (103) Caffarelli C, Cavagni G, Giordano S, Stapane I, Rossi C. Relationship between oral challenges with previously uningested egg and egg-specific IgE antibodies and skin prick tests in infants with food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95:1215-1220.
- (104) Hansen TK, Bindslev-Jensen C, Skov PS, Poulsen LK. Codfish allergy in adults. Specific tests for IgE and histamine release vs double-blind, placebo-controlled challenges. *Clin Exp Allergy*. 1996;26:1276-1285.
- (105) Norgaard A, Bindslev-Jensen C. Egg and milk allergy in adults. Diagnosis and characterization. *Allergy*. 1992;47:503-509.
- (106) Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:444-451.
- (107) Niggemann B, Reibel S, Wahn U. The atopy patch test (APT)-- a useful tool for the diagnosis of food allergy in children with atopic dermatitis. *Allergy*. 2000;55:281-285.
- (108) Roehr CC, Reibel S, Ziegert M, Sommerfeld C, Wahn U, Niggemann B. Atopy patch tests, together with determination of specific IgE levels, reduce the need for oral food

- challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:548-553.
- (109) Perry TT, Matsui EC, Conover-Walker MK, Wood RA. Risk of oral food challenges. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1164-1168.
- (110) Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods--position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*. 2004;59:690-697.
- (111) Niggemann B, Rolinck-Werninghaus C, Mehl A, Binder C, Ziegert M, Beyer K. Controlled oral food challenges in children--when indicated, when superfluous? *Allergy*. 2005;60:865-870.
- (112) Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:981-989.
- (113) Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C et al. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *Clin Exp Allergy*. 2004;34:689-695.
- (114) González-Mancebo E, de la Hoz B. Técnicas para enmascarar alimentos. *Alergol Inmunol Clín*. 2004;19 (Extr. 2):177-178.
- (115) Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G et al. Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1046-1051.

-
- (116) Garcia-Ara C, Boyano-Martinez T, az-Pena JM, Martin-Munoz F, Reche-Frutos M, Martin-Esteban M. Specific IgE levels in the diagnosis of immediate hypersensitivity to cows' milk protein in the infant. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:185-190.
- (117) Sporik R, Hill DJ, Hosking CS. Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:1540-1546.
- (118) Celik-Bilgili S, Mehl A, Verstege A et al. The predictive value of specific immunoglobulin E levels in serum for the outcome of oral food challenges. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:268-273.
- (119) Garcia-Ara C, Boyano-Martinez T, az-Pena JM, Martin-Munoz F, Reche-Frutos M, Martin-Esteban M. Specific IgE levels in the diagnosis of immediate hypersensitivity to cows' milk protein in the infant. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:185-190.
- (120) Perry TT, Matsui EC, Kay Conover-Walker M, Wood RA. The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:144-149.
- (121) Shek LP, Soderstrom L, Ahlstedt S, Beyer K, Sampson HA. Determination of food specific IgE levels over time can predict the development of tolerance in cow's milk and hen's egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:387-391.
- (122) Garcia-Ara C, Boyano-Martinez T, Diaz-Pena MF, Martin-Esteban M. Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:866-870.

-
- (123) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270:467-470.
- (124) Schena M. Principles of Protein Microarrays. In: Mark Schena, ed. *Protein Microarrays*. Jones and Bartlett Publishers, Inc.; 2005:1-13.
- (125) Stein LD. Human genome: end of the beginning. *Nature*. 2004;431:915-916.
- (126) Braga-Neto UM, Marques ET, Jr. From functional genomics to functional immunomics: new challenges, old problems, big rewards. *PLoS Comput Biol*. 2006;2:e81.
- (127) Kusnezow W, Hoheisel JD. Antibody microarrays: promises and problems. *Biotechniques*. 2002;Suppl:14-23.
- (128) Pavlickova P, Knappik A, Kambhampati D, Ortigao F, Hug H. Microarray of recombinant antibodies using a streptavidin sensor surface self-assembled onto a gold layer. *Biotechniques*. 2003;34:124-130.
- (129) Bartling B, Hofmann HS, Boettger T et al. Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma. *Lung Cancer*. 2005;49:145-154.
- (130) Gao WM, Kuick R, Orckowski RP et al. Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis. *BMC Cancer*. 2005;5:110.
- (131) Quintana FJ, Hagedorn PH, Elizur G, Merbl Y, Domany E, Cohen IR. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future

- response of mice to induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101 Suppl 2:14615-14621.
- (132) Haab BB, Dunham MJ, Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol*. 2001;2:RESEARCH0004.
- (133) Feng Y, Ke X, Ma R, Chen Y, Hu G, Liu F. Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases. *Clin Chem*. 2004;50:416-422.
- (134) Hueber W, Kidd BA, Tomooka BH et al. Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2645-2655.
- (135) Chen Z, Pei D, Jiang L et al. Antigenicity analysis of different regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *Clin Chem*. 2004;50:988-995.
- (136) Bacarese-Hamilton T, Mezzasoma L, Ardizzoni A, Bistoni F, Crisanti A. Serodiagnosis of infectious diseases with antigen microarrays. *J Appl Microbiol*. 2004;96:10-17.
- (137) Neuman d, V, Robinson WH. Microarray profiling of antiviral antibodies for the development of diagnostics, vaccines, and therapeutics. *Clin Immunol*. 2004;111:196-201.
- (138) Bacarese-Hamilton T, Mezzasoma L, Ingham C et al. Detection of allergen-specific IgE on microarrays by use of signal amplification techniques. *Clin Chem*. 2002;48:1367-1370.

-
- (139) Flinterman AE, Knol EF, Lencer D et al. Peanut epitopes for IgE and IgG4 in peanut-sensitized children in relation to severity of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;in press.
- (140) Harwanegg C, Laffer S, Hiller R et al. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:7-13.
- (141) Shreffler WG, Beyer K, Chu TH, Burks AW, Sampson HA. Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:776-782.
- (142) Shreffler WG, Lencer DA, Bardina L, Sampson HA. IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:893-899.
- (143) Soen Y, Chen DS, Kraft DL, Davis MM, Brown PO. Detection and characterization of cellular immune responses using peptide-MHC microarrays. *PLoS Biol*. 2003;1:E65.
- (144) Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:1256-1262.
- (145) Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:379-383.
- (146) Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:1599-1606.

- (147) Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:3998-4002.
- (148) Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G, Schoofs PG. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods*. 1987;102:259-274.
- (149) Yu JW, Kagan R, Verreault N et al. Accidental ingestions in children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:466-472.
- (150) Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *Ann Emerg Med*. 2006;47:373-380.
- (151) Kemp AS, Hill DJ, Allen KJ et al. Guidelines for the use of infant formulas to treat cows milk protein allergy: an Australian consensus panel opinion. *Med J Aust*. 2008;188:109-112.
- (152) de Blok BM, Vlieg-Boerstra BJ, Oude Elberink JN et al. A framework for measuring the social impact of food allergy across Europe: a EuroPrevall state of the art paper. *Allergy*. 2007;62:733-737.
- (153) Shaikh WA. Cetirizine: effective treatment for food (egg) allergy. *Allergy*. 1996;51:275-276.
- (154) Burks AW, Sampson HA. Double-blind placebo-controlled trial of oral cromolyn in children with atopic dermatitis and documented food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;81:417-423.

-
- (155) Businco L, Cantani A, Benincori N et al. Effectiveness of oral sodium cromoglycate (SCG) in preventing food allergy in children. *Ann Allergy*. 1983;51:47-50.
- (156) Enrique E, Pineda F, Malek T et al. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:1073-1079.
- (157) Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99:744-751.
- (158) Oppenheimer JJ, Nelson HS, Bock SA, Christensen F, Leung DY. Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;90:256-262.
- (159) Patriarca G, Nucera E, Roncallo C et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17:459-465.
- (160) Fernández-Rivas M, Garrido S, Nadal JA et al. Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy*. In press.
- (161) Bauer A, Ekanayake MS, Wigger-Alberti W, Elsner P. Oral rush desensitization to milk. *Allergy*. 1999;54:894-895.
- (162) Patriarca G, Schiavino D, Nucera E, Schinco G, Milani A, Gasbarrini GB. Food allergy in children: results of a standardized protocol for oral desensitization. *Hepatogastroenterology*. 1998;45:52-58.
- (163) Patriarca G, Nucera E, Roncallo C et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17:459-465.

-
- (164) Meglio P, Giampietro PG, Gianni S, Galli E. Oral desensitization in children with immunoglobulin E-mediated cow's milk allergy - follow-up at 4 yr and 8 months. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008.
- (165) Meglio P, Bartone E, Plantamura M, Arabito E, Giampietro PG. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy*. 2004;59:980-987.
- (166) Meglio P, Bartone E, Plantamura M, Arabito E, Giampietro PG. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy*. 2004;59:980-987.
- (167) Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Guenard L et al. Oral desensitization in children with milk and egg allergies obtains recovery in a significant proportion of cases. A randomized study in 60 children with cow's milk allergy and 90 children with egg allergy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2007;39:12-19.
- (168) Niggemann B, Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Beyer K. Specific oral tolerance induction in food allergy. *Allergy*. 2006;61:808-811.
- (169) Patriarca G, Schiavino D, Nucera E, Schinco G, Milani A, Gasbarrini GB. Food allergy in children: results of a standardized protocol for oral desensitization. *Hepatogastroenterology*. 1998;45:52-58.
- (170) Patriarca G, Nucera E, Roncallo C et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17:459-465.
- (171) Rolinck-Werninghaus C, Staden U, Mehl A, Hamelmann E, Beyer K, Niggemann B. Specific oral tolerance induction with food in children: transient or persistent effect on food allergy? *Allergy*. 2005;60:1320-1322.

-
- (172) Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:1172-1177.
- (173) Bishop JM, Hill DJ, Hosking CS. Natural history of cow milk allergy: clinical outcome. *J Pediatr*. 1990;116:862-867.
- (174) Host A, Halken S, Jacobsen HP, Christensen AE, Herskind AM, Plesner K. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13 Suppl 15:23-28.
- (175) Martorell A, Plaza AM, Bone J et al. Cow's milk protein allergy. A multi-centre study: clinical and epidemiological aspects. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2006;34:46-53.
- (176) Brown SG. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:371-376.
- (177) The diagnosis and management of anaphylaxis: an updated practice parameter. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:S483-S523.
- (178) Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:981-989.
- (179) Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA*. 1994;271:703-707.
- (180) Crespo JF, Rodriguez J. Food allergy in adulthood. *Allergy*. 2003;58:98-113.

-
- (181) Poulos LM, Waters AM, Correll PK, Loblay RH, Marks GB. Trends in hospitalizations for anaphylaxis, angioedema, and urticaria in Australia, 1993-1994 to 2004-2005. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:878-884.
- (182) Simons FE, Sampson HA. Anaphylaxis epidemic: fact or fiction? *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:1166-1168.
- (183) Yocum MW, Butterfield JH, Klein JS, Volcheck GW, Schroeder DR, Silverstein MD. Epidemiology of anaphylaxis in Olmsted County: A population-based study. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:452-456.
- (184) Sackett DL, Haynes RB. The architecture of diagnostic research. *BMJ*. 2002;324:539-541.
- (185) Abaira V. Índices de rendimiento de la pruebas diagnósticas. *SEMER-GEN*. 2002;193-194.
- (186) Fagan TJ. Letter: Nomogram for Bayes theorem. *N Engl J Med*. 1975;293:257.
- (187) Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:891-896.
- (188) Perry TT, Matsui EC, Kay Conover-Walker M, Wood RA. The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:144-149.
- (189) Vanto T, Helppila S, Juntunen-Backman K et al. Prediction of the development of tolerance to milk in children with cow's milk hypersensitivity. *J Pediatr*. 2004;144:218-222.

-
- (190) Vanto T, Hamalainen KM, Vahteristo M, Wille S, Nja F, Hyldebrandt N. Comparison of two budesonide dry powder inhalers in the treatment of asthma in children. *J Aerosol Med.* 2004;17:15-24.
- (191) Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Di CM, Rossi R, Bistoni F, Crisanti A. Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* 2002;48:121-130.
- (192) Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 2001;31:1256-1262.
- (193) Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107:379-383.
- (194) Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy.* 2001;31:1599-1606.
- (195) Flinterman AE, Knol EF, Lencer DA et al. Peanut epitopes for IgE and IgG4 in peanut-sensitized children in relation to severity of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:737-743.
- (196) Shreffler WG, Beyer K, Chu TH, Burks AW, Sampson HA. Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:776-782.
- (197) Shreffler WG, Lencer DA, Bardina L, Sampson HA. IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:893-899.

-
- (198) Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:379-383.
- (199) Spuergin P, Mueller H, Walter M, Schiltz E, Forster J. Allergenic epitopes of bovine alpha S1-casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy*. 1996;51:306-312.
- (200) Elsayed S, Hill DJ, Do TV. Evaluation of the allergenicity and antigenicity of bovine-milk alphas1-casein using extensively purified synthetic peptides. *Scand J Immunol*. 2004;60:486-493.
- (201) Nakajima-Adachi H, Hachimura S, Ise W et al. Determinant analysis of IgE and IgG4 antibodies and T cells specific for bovine alpha(s)1-casein from the same patients allergic to cow's milk: existence of alpha(s)1-casein-specific B cells and T cells characteristic in cow's-milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101:660-671.
- (202) Busse PJ, Jarvinen KM, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha(s2)-casein in cow's milk allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;129:93-96.
- (203) Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:1256-1262.
- (204) Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126:111-118.
- (205) Sackett DL, Haynes RB. The architecture of diagnostic research. *BMJ*. 2002;324:539-541.

- (206) Van den BA, Cleemput I, Aertgeerts B, Ramaekers D, Buntinx F. The evaluation of diagnostic tests: evidence on technical and diagnostic accuracy, impact on patient outcome and cost-effectiveness is needed. *J Clin Epidemiol.* 2007;60:1116-1122.



Capítulo 10

ANEXOS

Anexo 1:

‘Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with peptide microarra-based immunoassay’ J ALLEGY CLIN IMMUNOL 122 (3): 589-594.

Anexo 2:



NORMAS DIETÉTICAS PARA ALÉRGICOS A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA

DIETA PARA LA ELIMINACIÓN DE LECHE Y DERIVADOS

1. Deben eliminarse de la dieta la leche de vaca y todos los derivados lácteos: yogur, queso, flan, natillas, cuajada, mantequilla, nata, crema de leche, arroz con leche, etc
2. NO puede tomar queso ni leche de cabra, de oveja o de búfala (mozzarella)
3. Leer atentamente las etiquetas de los alimentos. Dentro de una misma categoría, unos pueden llevar proteínas de leche de vaca y otros no.
4. Las proteínas de la leche de vaca pueden aparecer bajo diversas denominaciones:
 - caseinato de sodio
 - caseinato de calcio
 - caseinato potásico
 - caseinato magnésico
 - hidrolizado proteico
 - caseína
 - suero láctico
 - H4511 (caseinato cálcico)
 - H4512 (caseinato sódico)
 - Lactalbúmina
 - lactoglobulina.
5. En la elaboración de pan de panadería, pan de molde o de "Viena" se emplean este tipo de sustancias. Hay que tener especial atención con dichos productos, informándose debidamente en la panadería de consumo habitual.
6. Productos etiquetados como "no lácteos" contienen con frecuencia caseinato sódico

Pacientes altamente sensibilizados puede presentar excepcionalmente reacción alérgica en relación con productos que contengan lactosa contaminada por la proteína de origen.

Anexo 3:**HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE, PADRES Y/O REPRESENTANTE**

La alergia a leche es una de las causas más frecuente de alergia a alimentos en los primeros años de vida. Tras realizar una dieta exenta de estos alimentos muchos de los pacientes alérgicos llega a tolerarlos, sin embargo la alergia a leche persiste durante años en algunos pacientes. El estudio, en el que invitamos a participar a su hijo/a, es un proyecto científico auspiciado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad en el que participa el Servicio de Alergia del Hospital Ramón y Cajal, Hospital Niño Jesús y la Fundación Jiménez Díaz como Unidades Clínicas.

Este estudio tiene como objetivo evaluar las pruebas diagnósticas utilizadas en pacientes alérgicos a las proteínas de la leche de vaca (PLV) para discriminar aquellos que alcanzarán la tolerancia en la provocación oral de los que no lo harán.

Su hijo/a ha sido seleccionado porque padece una alergia a proteínas de leche de vaca. Si usted accede a que su hijo/a participe, se le someterá a un estudio alergológico que consistirá en la realización de pruebas cutáneas, una extracción de sangre y en una prueba de provocación con leche.

Las pruebas cutáneas se utiliza habitualmente para diagnosticar cualquier tipo de alergia. Consisten en una pequeña punción en la piel del brazo, después de aplicar el alimento (en líquido). Para este estudio se le harán pruebas cutáneas (práctica habitual para el diagnóstico de alergia) por duplicado, con el extracto de leche y sus proteínas, por lo que se aumentará el número de pruebas cutáneas con respecto a las que se realizarían en la práctica habitual.

Además se le extraerá un volumen de sangre 10 cc superior al necesario para realizar la analítica de rutina. Los riesgos de esta técnica son los habituales de una extracción sanguínea de rutina (hematoma local, mareo..)

La prueba de provocación consiste en que su hijo/a ingiera cantidades crecientes del alimento para determinar si le produce alguna reacción. Esta prueba puede ocasionar con frecuencia picor de boca, de garganta, habones alrededor de la boca, hinchazón de labios y/o vómitos. Con menos frecuencia, urticaria generalizada, dificultad respiratoria, mareo y/o malestar

general. Excepcionalmente las reacciones pueden ser graves. Esta prueba es importante para decidir si su hijo/a va a poder comer o no el alimento.

Las pruebas se realizarán con el equipo técnico y personal sanitario especializado en las mismas, estando protegido continuamente con la asistencia médica y sanitaria adecuada y con los tratamientos que precise.

Al ser un estudio de investigación, no anticipamos ningún beneficio directo para su hijo/a. Esperamos que los resultados que obtengamos nos ayude disponer de herramientas diagnósticas más eficaces en el diagnóstico evolutivo de la alergia a proteínas de leche de vaca.

Se garantiza la confidencialidad, tanto de la recogida de muestras como en la obtención de los resultados, según la legislación sobre protección de datos vigentes en España, Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.. Los investigadores del proyecto sólo tendrán acceso a los datos de la Historia Clínica relativos al estudio. Ningún participante en el estudio será identificado cuando se comuniquen los resultados en publicaciones o reuniones científicas

No existe compensación económica por participar en el estudio.

Antes de decidir si desea que su hijo/a participe o no en el estudio, realice cuantas preguntas quiera y solicite todas las aclaraciones que desee. Debe saber que la participación de su hijo/a es libre, y que si en cualquier momento decide abandonar el estudio, esto no supondrá ningún menoscabo en su relación con su médico especialista ni en seguir recibiendo el tratamiento adecuado para el control de su enfermedad.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ESTUDIO DE ALERGIA A PROTEINAS DE LA LECHE (ALPROLEVA) EN LA POBLACION INFANTIL.

Yo:..... (nombre y apellidos):

- He leído la Hoja de información que se me ha entregado.
- Me han sido explicados los posibles beneficios y riesgos del estudio y de los procedimientos mencionados.
- Estoy satisfecho de la información recibida.
- He podido formular todas las preguntas que he creído conveniente, y he tenido la oportunidad de aclarar mis dudas.
- Entiendo que mi participación en el ensayo es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 1. Cuando quiera
 2. Sin tener que dar explicaciones
 3. Sin que esto repercuta en los cuidados médicos a mí o a mi hijo.

Presto mi conformidad para participar en el estudio.

Nombre del participante	Fecha y Firma
Nombre del/los padre/s o Representantes legales del participante	Fecha y Firma
Nombre del investigador que llevo acabo el procedimiento de consentimiento informado	Fecha y Firma

Anexo 4:**APROBACIÓN POR PARTE DEL COMITÉ ÉTICO DEL HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL.**

Hospital Ramón y Cajal

Comité Ético de Investigación Clínica



Madrid

DÑA. M. ANGELES GALVEZ MÚGICA, Secretaria del Comité Ético de Investigación
Clínica del Hospital Ramón y Cajal

CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica, en su reunión del día **13 de Septiembre de 2004**, (**Acta nº 136**), ha evaluado el **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

Título:

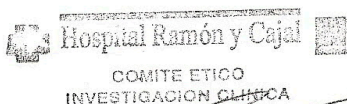
**EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO PARA TOLERANCIA A LAS
PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA EN POBLACIÓN INFANTIL (ALPROLEVA).**

Investigador/a Principal: Dra. D^a. BELEN DE LA HOZ CABALLER

Servicio: ALERGOLOGIA

Y ha decidido su **APROBACIÓN**.

Lo que firmo en Madrid a 15 de Septiembre de 2004



Fdo.: M. Angeles Gálvez Múgica
Secretaria CEIC.

Anexo 5:**RECOGIDA DE DATOS**

Nº IDENTIFICACIÓN:

PARAMETROS DE ESTUDIO:

Fecha de nacimiento:

Sexo: Varón Mujer

RELACIONADOS CON LA HISTORIA CLÍNICA:

Edad de aparición de sintomatología:

Clínica que presenta:

Número de toma:

OTRAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS ASOCIADAS:

Dermatitis atópica.

Alergia a otros alimentos.

Asma

EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS:

PC	
Leche	
Alfa-lactoalb.	
Beta-lactoglob	
Lactoferrina	
Caseína	
histamina	

IgE	
Leche	
Alfa-lactoalb.	
Beta-lactoglob	
Lactoferrina	
Caseína	
IgE total	

TRANSGRESIONES DIETÉTICAS:

SI: -Sin síntomas
 -Con síntomas (descripción de la clínica)

NO:

PROVOCACIÓN:

1. PROVOCACIÓN SI:

Test Cutáneo frente a leche	Alfa lactoalbúmina	Beta-Lactoglobulina	Caseína
IgE específica frente a leche	Alfa lactoalbúmina	Beta-Lactoglobulina	Caseína

TOLERANCIA:

SÍ

NO: características clínicas de la reacción y Tratamiento precisado

2. PROVOCACIÓN NO:

Causas de la falta de provocación

Anexo 6



PROTOCOLO DE DOSIS PROVOCACIÓN ORAL CON LECHE DE VACA

(1 día):

- Administración de 2 cc de leche de vaca
30 minutos
- Administración de 15 cc de leche de vaca
30 minutos
- Administración de 25 cc de leche de vaca
30 minutos
- Administración de 75 cc de leche de vaca
1 hora
- Administración de 200 cc de leche de vaca
2 horas

Anexo 7

PÉPTIDOS SOLICITADOS: SECUENCIA Y GRADO DE PUREZA.

Ident	Peptide Name	Marker	Sequence	MW (monoisotopic)	Purity	Label 1	MW 1	Ionisierung M	Label 2	MW 2	Ionisierung M	Label 3	MW 3	Ionisierung M
7239 001 W1	alpha s1_1	020506X-1	RPKHPKHQGLPQEVNLNLF	2346.24	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1174.8	ESI	[M+3H] ³⁺	783.5	ESI
7239 002	alpha s1_2	040306Y-1	HPKHQGLPQEVNLNLF	2381.25	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1191.8	ESI	[M+3H] ³⁺	785	ESI
7239 003	alpha s1_3	040306Y-1	KHQGLPQEVNLNLF	2351.24	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1169.9	ESI	[M+3H] ³⁺	784.8	ESI
7239 004 W2	alpha s1_4	021060X-2	GLPQEVNLNLF	2299.2	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1151.3	ESI	[M+3H] ³⁺	788	ESI
7239 005 W1	alpha s1_5	040306X-1	QEVNLNLF	2407.23	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1206.7	ESI	[M+3H] ³⁺	804	ESI
7239 006	alpha s1_6	040306Y-1	QEVNLNLF	2407.23	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1184.3	ESI	[M+3H] ³⁺	789.8	ESI
7239 007 W1	alpha s1_7	020506X-5	NLLPFAVPEVFGKVN	2350.25	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1176.8	ESI	[M+3H] ³⁺	785	ESI
7239 008	alpha s1_8	040306Y-7	RFVAPFVFGKVN	2339.2	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1171.1	ESI	[M+3H] ³⁺	780.9	ESI
7239 009 W1	alpha s1_9	040306X-3	VAPFVFGKVN	2245.16	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1124.2	ESI	[M+3H] ³⁺	749.8	ESI
7239 010	alpha s1_10	040306Y-1	FEVFGKVN	2251.09	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1127.2	ESI	[M+3H] ³⁺	751.8	ESI
7239 011	alpha s1_11	040306Y-1	FEVFGKVN	2195.05	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1099.2	ESI	[M+3H] ³⁺	733.2	ESI
7239 012	alpha s1_12	040306Y-1	KEVNLNLF	2206.02	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1104.6	ESI	[M+3H] ³⁺	736.7	ESI
7239 013	alpha s1_13	040306Y-1	KEVNLNLF	2195.91	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1099.6	ESI	[M+3H] ³⁺	735.5	ESI
7239 014	alpha s1_14	040306Y-2	KEVNLNLF	2222.98	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1113.1	ESI	[M+3H] ³⁺	742.3	ESI
7239 015	alpha s1_15	040306Y-2	KEVNLNLF	2222.98	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1114.7	ESI	[M+3H] ³⁺	743.4	ESI
7239 016	alpha s1_16	040306Y-1	KEVNLNLF	2222.98	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1115.6	ESI	[M+3H] ³⁺	744.2	ESI
7239 017	alpha s1_17	040306Y-1	KEVNLNLF	2222.98	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1118.8	ESI	[M+3H] ³⁺	746.2	ESI
7239 018 W1	alpha s1_18	040306X-10	QAMEDIKQEVNLNLF	2253.96	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1097.6	ESI	[M+3H] ³⁺	734.2	ESI
7239 019	alpha s1_19	021060X-3	EDIKQEVNLNLF	2233.96	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1100.3	ESI	[M+3H] ³⁺	747.5	ESI
7239 020	alpha s1_20	040306Y-1	KEVNLNLF	2197.99	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1148.8	ESI	[M+3H] ³⁺	766.2	ESI
7239 021	alpha s1_21	040306Y-1	KEVNLNLF	2197.99	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1153.8	ESI	[M+3H] ³⁺	769.5	ESI
7239 022 W1	alpha s1_22	020506X-12	KEVNLNLF	2381.1	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1198.9	ESI	[M+3H] ³⁺	799.7	ESI
7239 023	alpha s1_23	040306Y-1	KEVNLNLF	2381.1	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1216.3	ESI	[M+3H] ³⁺	811.3	ESI
7239 024	alpha s1_24	040306Y-1	KEVNLNLF	2381.1	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1224	ESI	[M+3H] ³⁺	815.8	ESI
7239 025 W1	alpha s1_25	020506X-14	KEVNLNLF	2442.22	>90%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1223.8	ESI	[M+3H] ³⁺	816.3	ESI
7239 026	alpha s1_26	040306Y-27	KEVNLNLF	2482.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1242.4	ESI	[M+3H] ³⁺	828.6	ESI
7239 027 W1	alpha s1_27	020506X-16	KEVNLNLF	2482.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1248	ESI	[M+3H] ³⁺	832.3	ESI
7239 028 W2	alpha s1_28	040306Y-3	KEVNLNLF	2482.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1237.6	ESI	[M+3H] ³⁺	824.8	ESI
7239 029 W2	alpha s1_29	040306Y-3	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1199.6	ESI	[M+3H] ³⁺	800	ESI
7239 030	alpha s1_30	040306Y-2	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1168.8	ESI	[M+3H] ³⁺	780.2	ESI
7239 031 W2	alpha s1_31	021060X-4	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1154.3	ESI	[M+3H] ³⁺	769.8	ESI
7239 032 W3	alpha s1_32	040306Y-2	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1145.3	ESI	[M+3H] ³⁺	763.8	ESI
7239 033	alpha s1_33	040306Y-1	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1131.4	ESI	[M+3H] ³⁺	754.5	ESI
7239 034	alpha s1_34	040306Y-23	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1153.2	ESI	[M+3H] ³⁺	769	ESI
7239 035 W1	alpha s1_35	020506X-23	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1160.8	ESI	[M+3H] ³⁺	774.3	ESI
7239 036	alpha s1_36	040306Y-1	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1132.3	ESI	[M+3H] ³⁺	755.2	ESI
7239 037 W1	alpha s1_37	020506X-24	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1111.3	ESI	[M+3H] ³⁺	741.2	ESI
7239 038 W2	alpha s1_38	040306Y-2	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1199.3	ESI	[M+3H] ³⁺	794.3	ESI
7239 039 W1	alpha s1_39	040306Y-2	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1222.8	ESI	[M+3H] ³⁺	840	ESI
7239 040	alpha s1_40	040306Y-2	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1263.9	ESI	[M+3H] ³⁺	842.9	ESI
7239 041 W1	alpha s1_41	020506X-26	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1278.8	ESI	[M+3H] ³⁺	852.9	ESI
7239 042 W1	alpha s1_42	020506X-27	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1266.9	ESI	[M+3H] ³⁺	845	ESI
7239 043 W1	alpha s1_43	020506X-28	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1250.8	ESI	[M+3H] ³⁺	840	ESI
7239 044 W2	alpha s1_44	040306Y-2	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1198.3	ESI	[M+3H] ³⁺	794.3	ESI
7239 045 W2	alpha s1_45	020506X-34	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1222.8	ESI	[M+3H] ³⁺	840	ESI
7239 046 W1	alpha s1_46	020506X-31	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1263.9	ESI	[M+3H] ³⁺	842.9	ESI
7239 047	alpha s1_47	040306Y-1	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1278.8	ESI	[M+3H] ³⁺	852.9	ESI
7239 048 W1	alpha s1_48	020506X-32	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1266.9	ESI	[M+3H] ³⁺	845	ESI
7239 049	alpha s1_49	040306Y-3	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1250.8	ESI	[M+3H] ³⁺	840	ESI
7239 050 W1	alpha s1_50	020506X-34	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1198.3	ESI	[M+3H] ³⁺	794.3	ESI
7239 051 W1	alpha s1_51	050706X-3	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1222.8	ESI	[M+3H] ³⁺	840	ESI
7239 052	alpha s1_52	040306Y-1	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1263.9	ESI	[M+3H] ³⁺	842.9	ESI
7239 053	alpha s1_53	040306Y-1	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1278.8	ESI	[M+3H] ³⁺	852.9	ESI
7239 054 W1	alpha s1_54	040306Y-1	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1266.9	ESI	[M+3H] ³⁺	845	ESI
7239 055 W1	alpha s1_55	020506X-36	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1250.8	ESI	[M+3H] ³⁺	840	ESI
7239 056 W4	alpha s1_56	020706X-73	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1198.3	ESI	[M+3H] ³⁺	794.3	ESI
7239 057 W1	alpha s1_57	020506X-38	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1222.8	ESI	[M+3H] ³⁺	840	ESI
7239 058	alpha s1_58	040306Y-32	KEVNLNLF	2396.3	>70%	(HPLC)	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1263.9	ESI	[M+3H] ³⁺	842.9	ESI

7239 059 W1	alpha s1 59	020506X-40	DAPSPDIPNPIGSENSEKT	2103,92 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1053,5 ESI	[M+3H] ⁺	702,8 ESI
7239 060	alpha s1 60	040306Y2-75	SFSDIPNPIGSENSEKTMP	2149,94 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1076,7 ESI	[M+3H] ⁺	-
7239 061 W1	alpha s1 61	020506X-41	SOIPNPIGSENSEKTMPW	2215 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1109,3 ESI	[M+3H] ⁺	739,9 ESI
7239 062	alpha s2 1	020306Y3-68	KNTMEHVSSEESISQIETW	2287,99 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1150,2 ESI	[M+3H] ⁺	-
7239 063 W2	alpha s2 2	020606X-20	MEHVSSSEESISQIETW	2340 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1171,7 ESI	[M+3H] ⁺	781,5 ESI
7239 064	alpha s2 3	040306Y2-54	VSSSEESISQIETWKOENM	2316,03 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1159,8 ESI	[M+3H] ⁺	773,5 ESI
7239 065	alpha s2 4	040306Y2-60	SEESISQIETWKOENM	2341,06 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1172,3 ESI	[M+3H] ⁺	782 ESI
7239 066 W1	alpha s2 5	020506X-45	SISQIETWKOENM	2308,12 >90% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1155,8 ESI	[M+3H] ⁺	770,8 ESI
7239 067	alpha s2 6	040306Y2-31	SOETWKOENM	2351,09 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1177,7 ESI	[M+3H] ⁺	784,8 ESI
7239 068 W1	alpha s2 7	020506X-46	QYKQENMANPSENLCST	2298,05 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1150,8 ESI	[M+3H] ⁺	763,7 ESI
7239 069	alpha s2 8	040306Y2-3	QYKQENMANPSENLCST	2264,02 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1143,3 ESI	[M+3H] ⁺	767,6 ESI
7239 070 W1	alpha s2 9	020506X-47	NMANPSENLCST	2226,01 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1148,8 ESI	[M+3H] ⁺	743,5 ESI
7239 071 W2	alpha s2 10	020606X-12	NPSKENLCST	2251,07 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1127,3 ESI	[M+3H] ⁺	751,8 ESI
7239 072	alpha s2 11	040306Y1-41	SKENLCST	2298,02 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1151,2 ESI	[M+3H] ⁺	767,8 ESI
7239 073	alpha s2 12	040306Y3-33	NLCST	2333,99 >90% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1168,7 ESI	[M+3H] ⁺	779,7 ESI
7239 074	alpha s2 13	040306Y3-34	STCKEVRNANEESIGS	2260,99 >90% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1132,2 ESI	[M+3H] ⁺	755,2 ESI
7239 075 W1	alpha s2 14	020506X-52	CKEVRNANEESIGS	2228,94 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1116,3 ESI	[M+3H] ⁺	-
7239 076 W2	alpha s2 15	020606X-25	VVRNANEESIGS	2155,91 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1079,7 ESI	[M+3H] ⁺	-
7239 077	alpha s2 16	040306Y1-10	NANEEYSGSSESAEVA	2100,82 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1051,2 ESI	[M+3H] ⁺	-
7239 078 W1	alpha s2 17	020506X-54	EEYSGSSESAEVA	2160,83 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1082,1 ESI	[M+3H] ⁺	-
7239 079	alpha s2 18	040306Y1-81	YSIGSSESAEVA	2113,95 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1059,7 ESI	[M+3H] ⁺	-
7239 080 W1	alpha s2 19	020506X-55	GSSESAEVA	2065,93 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1034,3 ESI	[M+3H] ⁺	-
7239 081	alpha s2 20	040306Y1-71	SESAEVA	2215,03 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1108,8 ESI	[M+3H] ⁺	739,8 ESI
7239 082	alpha s2 21	040306Y2-4	SAEVA	2289,13 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1146,3 ESI	[M+3H] ⁺	764,5 ESI
7239 083	alpha s2 22	040306Y2-61	VATEEVKTDKHYKALN	2300,18 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1151,8 ESI	[M+3H] ⁺	768,2 ESI
7239 084 W1	alpha s2 23	020506X-56	EEVKTDKHYKALN	2385,18 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1194,3 ESI	[M+3H] ⁺	796,6 ESI
7239 085 W1	alpha s2 24	020506X-57	KTVDDKHYKALN	2466,23 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1234,8 ESI	[M+3H] ⁺	823,6 ESI
7239 086 W1	alpha s2 25	020506X-58	VDDKHYKALN	2527,22 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1285,3 ESI	[M+3H] ⁺	844,0 ESI
7239 087	alpha s2 26	040306Y3-90	KHYKALN	2586,26 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1294,8 ESI	[M+3H] ⁺	863,4 ESI
7239 088 W1	alpha s2 27	020506X-60	KALN	2562,25 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1274,4 ESI	[M+3H] ⁺	-
7239 089 W1	alpha s2 28	020506X-61	NEINQYKFPQYLYQ	2639,26 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1321,8 ESI	[M+3H] ⁺	-
7239 091	alpha s2 29	040306Y2-63	INQYKFPQYLYQ	2550,25 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1277,0 ESI	[M+3H] ⁺	881,5 ESI
7239 092	alpha s2 30	040306Y2-63	FYKFPQYLYQ	2481,23 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1282,4 ESI	[M+3H] ⁺	851,9 ESI
7239 093 W2	alpha s2 31	040306Y1-26	KFPQYLYQ	2464,24 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1242,4 ESI	[M+3H] ⁺	842,1 ESI
7239 094	alpha s2 32	040306Y2-5	OYLYQYKFPQYLYQ	2464,24 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1233,9 ESI	[M+3H] ⁺	828,5 ESI
7239 095	alpha s2 33	040306Y1-11	OYLYQYKFPQYLYQ	2401,22 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1202,3 ESI	[M+3H] ⁺	802 ESI
7239 096 W1	alpha s2 34	040306Y1-83	YQYKFPQYLYQ	2306,22 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1154,8 ESI	[M+3H] ⁺	770,3 ESI
7239 097 W2	alpha s2 35	020506X-62	PVLPWDQYKRNAPITPT	2257,23 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1130,3 ESI	[M+3H] ⁺	753,8 ESI
7239 098 W2	alpha s2 36	2607062-06	LPWDQYKRNAPITPT	2331,25 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1167,3 ESI	[M+3H] ⁺	778,5 ESI
7239 099 W2	alpha s2 37	040306Y2-32	WDQYKRNAPITPT	2377,26 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1189,7 ESI	[M+3H] ⁺	793,7 ESI
7239 100	alpha s2 38	020606X-26	VKNAPITPT	2223,2 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1113,3 ESI	[M+3H] ⁺	742,5 ESI
7239 101	alpha s2 39	040306Y2-64	NAVPTPT	2212,06 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1107,8 ESI	[M+3H] ⁺	738,8 ESI
7239 102 W1	alpha s2 40	040306Y2-6	PIPTPT	2275,09 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1136,9 ESI	[M+3H] ⁺	758,5 ESI
7239 103	alpha s2 41	020506X-66	PTLNREQLSTSEENSKTVD	2275,09 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1139,8 ESI	[M+3H] ⁺	759,8 ESI
7239 104	alpha s2 42	040306Y3-36	NREQLSTSEENSKTVD	2311,02 >90% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1157,2 ESI	[M+3H] ⁺	771,8 ESI
7239 105	alpha s2 43	040306Y3-61	QLSTSEENSKTVD	2241 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1122,2 ESI	[M+3H] ⁺	748,5 ESI
7239 106 W1	alpha s2 44	040306Y2-7	TSEENSKTVD	2289,04 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1146,3 ESI	[M+3H] ⁺	764,5 ESI
7239 107 W1	alpha s2 45	020506X-69	ENSKTVD	2329,15 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1166,2 ESI	[M+3H] ⁺	777,8 ESI
7239 108 W1	alpha s2 46	020506X-70	KTVDMESTVFTKTTE	2342,21 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1173,4 ESI	[M+3H] ⁺	782,3 ESI
7239 109	alpha s2 47	020506X-71	KTVDMESTVFTKTTE	2371,15 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1187,3 ESI	[M+3H] ⁺	791,9 ESI
7239 110	alpha s2 48	040306Y2-33	ESTVFTKTTE	2409,23 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1206,3 ESI	[M+3H] ⁺	804,7 ESI
7239 111	alpha s2 49	040306Y2-34	EVFTKTTE	2466,3 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1234,9 ESI	[M+3H] ⁺	823,7 ESI
7239 112 W3	alpha s2 50	040306Y1-84	TKTKTKTE	2460,38 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1231,3 ESI	[M+3H] ⁺	821,4 ESI
7239 113	alpha s2 51	050706A5	TKTKTE	2474,34 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1239,0 ESI	[M+3H] ⁺	826,5 ESI
7239 114	alpha s2 52	040306Y2-10	TEENKRNLF	2551,33 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1239,0 ESI	[M+3H] ⁺	852 ESI
7239 115 W1	alpha s2 53	040306Y2-35	ENKRNLF	2523,39 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1263,4 ESI	[M+3H] ⁺	842,8 ESI
7239 116 W1	alpha s2 54	020506X-77	RNFLLKISQYKQFAL	2540,39 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1272,0 ESI	[M+3H] ⁺	848,4 ESI
7239 117 W1	alpha s2 55	020506X-78	FLKISQYKQFAL	2499,39 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1251,4 ESI	[M+3H] ⁺	834,8 ESI
7239 117 W2	alpha s2 56	210606X-15	KISQYKQFAL	2501,34 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1252,4 ESI	[M+3H] ⁺	835,3 ESI

7239 118	alpha s2 57	040306Y2-11	QRYQKFPALPYLKYVYQHQK	2566.35	>70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1285.3	ESI	[M+3H] ⁺	857.3	ESI
7239 119	alpha s2 58	040306Y2-12	QKFPALPYLKYVYQHQKAMK	2449.3	>70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ⁺	1226.3	ESI	[M+3H] ⁺	818	ESI
7239 120	alpha s2 59	020506X-82	ALPOYLKYVYQHQKAMKPIWI	2442.29	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1222.9	ESI	[M+3H] ⁺	815.7	ESI
7239 121	alpha s2 60	020506X-83	OYLKYVYQHQKAMKPIWIQPK	2514.32	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1258.9	ESI	[M+3H] ⁺	839.7	ESI
7239 122	alpha s2 61	020506X-84	KYVYQHQKAMKPIWIQPKTKV	2438.33	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1220.8	ESI	[M+3H] ⁺	814.3	ESI
7239 123	alpha s2 62	020506X-85	YQHQKAMKPIWIQPKTKVPIY	2463.31	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1243.4	ESI	[M+3H] ⁺	829.3	ESI
7239 124	alpha s2 63	040306Y3-94	QKAMKPIWIQPKTKVPIYVYR	2473.36	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1238.1	ESI	[M+3H] ⁺	825.8	ESI
7239 125	alpha s2 64	020506X-87	KAMKPIWIQPKTKVPIYVYR	2466.38	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1230.9	ESI	[M+3H] ⁺	821.0	ESI
7239 126	beta cas 1	040306Y1-45	RELELVNPGVEISLSSSE	2215.03	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1108.5	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 127	beta cas 2	020506X-98	EELNVPGEISLSSSE	2145.96	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1074.6	ESI	[M+3H] ⁺	716.8	ESI
7239 128	beta cas 3	020506X-99	NVPGEISLSSSE	2145.03	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1074.2	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 129	beta cas 4	020506X-90	GEVLSLSSSE	2205.09	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1139.9	ESI	[M+3H] ⁺	736.5	ESI
7239 130	beta cas 5	040306Y2-15	VESLSSSESTRINKK	2276.16	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1163.3	ESI	[M+3H] ⁺	760.2	ESI
7239 131	beta cas 6	020506X-91	SSSESTRINKK	2323.18	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1212.0	ESI	[M+3H] ⁺	775.9	ESI
7239 132	beta cas 7	040306Y3-6	SESTRINKK	2422.18	>90%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1218.9	ESI	[M+3H] ⁺	808.7	ESI
7239 133	beta cas 8	020506X-93	SITRINKK	2434.24	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1254.8	ESI	[M+3H] ⁺	813.0	ESI
7239 134	beta cas 9	020506X-94	RINKK	2506.19	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1218.9	ESI	[M+3H] ⁺	836.9	ESI
7239 135	beta cas 10	020506X-95	KKIEK	2479.14	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1241.3	ESI	[M+3H] ⁺	827.9	ESI
7239 136	beta cas 11	040306Y1-72	EKFQSEQQTEDELDQKH	2488.11	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1245.8	ESI	[M+3H] ⁺	830.9	ESI
7239 137	beta cas 12	040306Y1-12	QSEEQQTEDELDQKHFA	2399.07	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1192.8	ESI	[M+3H] ⁺	795.5	ESI
7239 138	beta cas 13	020506X-96	EQQTEDELDQKHFA	2412.11	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1207.8	ESI	[M+3H] ⁺	805.7	ESI
7239 139	beta cas 14	040306Y3-63	QTEDELDQKHFAQTSQV	2326.13	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1164.3	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 140	beta cas 15	040306Y1-63	DELDQKHFAQTSQV	2375.16	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1189.3	ESI	[M+3H] ⁺	793.2	ESI
7239 141	beta cas 16	040306Y2-76	QDKHFAQTSQV	2299.13	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1136.3	ESI	[M+3H] ⁺	757.8	ESI
7239 142	beta cas 17	040306Y2-65	HPFAQTSQV	2222.12	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1087.7	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 143	beta cas 18	040306Y2-77	FAQTSQV	2172.09	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1091.8	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 144	beta cas 19	040306Y1-88	TQSLVYPPGIPNLSQV	2181.11	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1087.2	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 145	beta cas 20	040306Y3-52	LYPPGIPNLSQV	2172.14	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1064.8	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 146	beta cas 21	040306Y3-52	PPGIPNLSQV	2127.09	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1041.9	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 147	beta cas 22	040306Y3-64	GPINLSQV	2081.11	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1055.1	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 148	beta cas 23	040306Y2-78	PNSLPQV	2107.13	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1099.8	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 149	beta cas 24	040306Y3-8	LPQV	2197.22	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1093.5	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 150	beta cas 25	040306Y3-65	NIPPLTQV	2184.19	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1074.6	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 151	beta cas 26	040306Y3-66	PLTQV	2147.15	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1076.3	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 152	beta cas 27	040306Y3-21	QTPV	2150.16	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1077.3	ESI	[M+3H] ⁺	718.7	ESI
7239 153	beta cas 28	040306Y1-13	VVPFLOV	2152.17	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1078.8	ESI	[M+3H] ⁺	719.5	ESI
7239 154	beta cas 29	040306Y2-79	PPFLOV	2154.09	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1104.2	ESI	[M+3H] ⁺	736.5	ESI
7239 155	beta cas 30	040306Y2-16	LQFV	2206.16	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1114.3	ESI	[M+3H] ⁺	743.2	ESI
7239 156	beta cas 31	040306Y2-80	EVMSV	2225.1	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1120.9	ESI	[M+3H] ⁺	747.5	ESI
7239 157	beta cas 32	040306Y2-17	GYSV	2238.16	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1178.4	ESI	[M+3H] ⁺	785.8	ESI
7239 158	beta cas 33	040306Y3-68	KYKEM	2354.22	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1187.3	ESI	[M+3H] ⁺	792.0	ESI
7239 159	beta cas 34	040306Y1-64	EAMK	2372.13	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1180.5	ESI	[M+3H] ⁺	787.2	ESI
7239 160	beta cas 35	040306Y3-38	APKEM	2358.13	>90%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1156.6	ESI	[M+3H] ⁺	798.2	ESI
7239 161	beta cas 36	040306Y2-38	HKEM	2390.12	>90%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1166.8	ESI	[M+3H] ⁺	771.3	ESI
7239 162	beta cas 37	040306Y3-53	MPKPY	2311.11	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1141.2	ESI	[M+3H] ⁺	761.0	ESI
7239 163	beta cas 38	040306Y1-47	PKPY	2279.09	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1129.2	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 164	beta cas 39	040306Y1-73	PPFTE	2255.07	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1128.3	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 165	beta cas 40	040306Y2-39	PFTE	2253.12	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1117.3	ESI	[M+3H] ⁺	745.2	ESI
7239 166	beta cas 41	040306Y2-40	ESQSL	2231.16	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1145.6	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 167	beta cas 42	040306Y3-84	SLTDL	2288.2	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1193.3	ESI	[M+3H] ⁺	766.0	ESI
7239 168	beta cas 43	040306Y3-10	LTDEN	2383.2	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1209.6	ESI	[M+3H] ⁺	806.5	ESI
7239 169	beta cas 44	040306Y3-9	LVNHL	2416.21	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1191.9	ESI	[M+3H] ⁺	794.8	ESI
7239 170	beta cas 45	040306Y2-81	LHLPL	2381.24	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1159.4	ESI	[M+3H] ⁺	773.5	ESI
7239 171	beta cas 46	040306Y3-58	PLPL	2315.19	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1183.4	ESI	[M+3H] ⁺	786.0	ESI
7239 172	beta cas 47	040306Y2-82	LLQSW	2383.17	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1172.8	ESI	[M+3H] ⁺	782.2	ESI
7239 173	beta cas 48	040306Y3-39	SWH	2341.09	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1120.3	ESI	[M+3H] ⁺	747.8	ESI
7239 174	beta cas 49	040306Y3-40	HQHP	2236.12	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1078.5	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 175	beta cas 50	040306Y3-11	LPPTV	2202.12	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1023.3	ESI	[M+3H] ⁺	-	ESI
7239 176	beta cas 51	040306Y3-70	LPPTV	2154.14	>70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ⁺	1078.5	ESI	[M+3H] ⁺	719.1	ESI

7239 177	beta cas 52	040306Y2-18	TMFFPQSVLSLSQSKVLPV	2156,16 >70%	[M+H] ⁺	2157,9	ESI	[M+2H] ²⁺	1079,4	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 178	beta cas 53	040306Y2-18	FPQSVLSLSQSKVLPVQPK	2178,2 >70%	[HPLC]	2182,5	ESI	[M+2H] ²⁺	1090,8	ESI	[M+3H] ³⁺	727,6	ESI
7239 179	beta cas 54	040306Y2-83	QSVLSLSQSKVLPVQKVPQ	2104,19 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1053,8	ESI	[M+3H] ³⁺	702,9	ESI
7239 180	beta cas 55	040306Y3-12	LSLSQSKVLPVQKVPQVPQ	2178,2 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1090,2	ESI	[M+3H] ³⁺	727,3	ESI
7239 181	beta cas 56	040306Y2-55	SQSKVLPVQKVPQVPQRM	2267,18 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1135,3	ESI	[M+3H] ³⁺	757,3	ESI
7239 182	beta cas 57	040306Y3-13	KVLPVQKVPQVPQRMQPK	2303,25 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1153,3	ESI	[M+3H] ³⁺	769,2	ESI
7239 183	beta cas 58	040306Y2-41	PVPQKVPQVPQRMQPK	2294,2 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1148,6	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 184	beta cas 59	040306Y3-12	QKVPQVPQRMQPKVFLY	2405,23 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1204,3	ESI	[M+3H] ³⁺	803,5	ESI
7239 185	beta cas 60	040306Y3-72	VPQRMQPKVFLYQEPV	2403,2 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1157,3	ESI	[M+3H] ³⁺	772,0	ESI
7239 186	beta cas 61	040306Y2-84	QKVPQKVPQVPQVPQ	2311,17 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1122,9	ESI	[M+3H] ³⁺	749,0	ESI
7239 187	beta cas 62	040306Y1-67	DMPIQKVPQVPQVPQ	2242,15 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1121,4	ESI	[M+3H] ³⁺	747,8	ESI
7239 188	beta cas 63	040306Y2-85	IQKVPQKVPQVPQVPQ	2240,2 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1127,8	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 189	beta cas 64	040306Y3-73	FLYQEPVLPQVPQVPQ	2253,25 >60%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1133,1	ESI	[M+3H] ³⁺	755,7	ESI
7239 190	beta cas 65	040306Y2-95	LIVQKVPQKVPQVPQ	2264,2 >60%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1106,1	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 191	beta cas 66	040306Y1-14	TOTKVPQKVPQVPQ	2210,12 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1078,3	ESI	[M+3H] ³⁺	719,3	ESI
7239 192	beta cas 67	040306Y1-15	MKGKVPQKVPQVPQ	2153,08 >70%	[M+H] ⁺	2156,4	ESI	[M+2H] ²⁺	1073,2	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 193	beta cas 68	040306Y1-89	LDQKVPQKVPQVPQ	2152,07 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1063,7	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 194	beta cas 69	040306Y2-42	QKVPQKVPQVPQVPQ	2124,07 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1043,2	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 195	beta cas 70	040306Y3-15	AGTWYSLMAASDLSLQ	2082,98 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1043,2	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 196	beta cas 71	040306Y2-86	WYSLMAASDLSLQ	2108,99 >70%	[M+H] ⁺	2128,76	MALDI	[M+H] ⁺	2129,1	ESI	[M+3H] ³⁺	1064,2	ESI
7239 197	beta cas 72	040306Y3-74	LAMAASDLSLQ	2041,07 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1021,5	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 198	beta cas 73	040306Y1-48	AASDLSLQ	2117,08 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1059,8	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 199	beta cas 74	040306Y2-19	DISLQKVPQVPQVPQ	2258,18 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1130,8	ESI	[M+3H] ³⁺	754,2	ESI
7239 200	beta cas 75	040306Y2-87	LDQKVPQKVPQVPQ	2338,19 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1120,8	ESI	[M+3H] ³⁺	747,5	ESI
7239 201	beta cas 76	040306Y1-29	AOSAPVYVEELKPTQ	2198,09 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1100,8	ESI	[M+3H] ³⁺	734,2	ESI
7239 202	beta cas 77	040306Y1-16	APVYVEELKPTQ	2267,16 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1135,3	ESI	[M+3H] ³⁺	757,3	ESI
7239 203	beta cas 78	040306Y3-16	RVYVEELKPTQ	2340,21 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1181,3	ESI	[M+3H] ³⁺	781,3	ESI
7239 204	beta cas 79	040306Y1-49	VEELKPTQ	2365,19 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1184,6	ESI	[M+3H] ³⁺	790,0	ESI
7239 205	beta cas 80	040306Y1-50	KPTQ	2330,04 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1166,8	ESI	[M+3H] ³⁺	778,4	ESI
7239 206	beta cas 81	040306Y3-17	TEGDELLQ	2372,16 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1201,9	ESI	[M+3H] ³⁺	791,7	ESI
7239 207	beta cas 82	040306Y1-91	GDELLQ	2402,22 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1203,2	ESI	[M+3H] ³⁺	801,9	ESI
7239 208	beta cas 83	040306Y1-51	ELLQ	2314,16 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1130,6	ESI	[M+3H] ³⁺	772,5	ESI
7239 209	beta cas 84	040306Y2-20	LQKVPQKVPQVPQ	2259,23 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1107,0	ESI	[M+3H] ³⁺	754,3	ESI
7239 210	beta cas 85	040306Y1-16	WENDECAKVPQ	2211,3 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1121,3	ESI	[M+3H] ³⁺	738,2	ESI
7239 211	beta cas 86	040306Y1-17	AKVPQKVPQVPQ	2240,27 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1116,3	ESI	[M+3H] ³⁺	747,9	ESI
7239 212	beta cas 87	040306Y1-52	KVPQKVPQVPQ	2227,22 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1113,9	ESI	[M+3H] ³⁺	744,0	ESI
7239 213	beta cas 88	040306Y3-75	AKVPQKVPQVPQ	2224,28 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1107,9	ESI	[M+3H] ³⁺	738,6	ESI
7239 214	beta cas 89	040306Y2-43	TKVPQKVPQVPQ	2213,17 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1183,9	ESI	[M+3H] ³⁺	789,6	ESI
7239 215	beta cas 90	040306Y1-30	PAVPQKVPQVPQ	2365,25 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1184,8	ESI	[M+3H] ³⁺	790,3	ESI
7239 216	beta cas 91	040306Y2-22	FKVPQKVPQVPQ	2400,2 >90%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1201,8	ESI	[M+3H] ³⁺	801,7	ESI
7239 217	beta cas 92	040306Y2-44	DALNENKVPQVPQ	2373,19 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1188,3	ESI	[M+3H] ³⁺	792,7	ESI
7239 218	beta cas 93	040306Y2-56	NENKVPQVPQVPQ	2330,08 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1166,8	ESI	[M+3H] ³⁺	778,2	ESI
7239 219	beta cas 94	040306Y3-41	KVLPQKVPQVPQ	2347,03 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1175,2	ESI	[M+3H] ³⁺	783,8	ESI
7239 220	beta cas 95	040306Y2-88	TDYKVPQKVPQVPQ	2283,05 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1141,5	ESI	[M+3H] ³⁺	762,6	ESI
7239 221	beta cas 96	040306Y3-42	TDYKVPQKVPQVPQ	2283,05 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1105,8	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 222	beta cas 97	040306Y1-23	KVLPQKVPQVPQ	2207,96 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1121,3	ESI	[M+3H] ³⁺	747,7	ESI
7239 223	beta cas 98	040306Y2-45	LLVQKVPQKVPQVPQ	2238,95 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1102,3	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 224	beta cas 99	040306Y3-54	CMENKVPQKVPQVPQ	2201,02 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1145,4	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 225	beta cas 100	040306Y3-76	NSAEPQKVPQVPQ	2288,01 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1124,8	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 226	beta cas 101	040306Y1-54	QSVQKVPQKVPQVPQ	2246,04 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1155,8	ESI	[M+3H] ³⁺	771	ESI
7239 227	beta cas 102	040306Y1-31	VQKVPQKVPQVPQ	2308,06 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1146,4	ESI	[M+3H] ³⁺	764,4	ESI
7239 228	beta cas 103	040306Y2-46	CLVQKVPQKVPQVPQ	2287,13 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1145,3	ESI	[M+3H] ³⁺	763,9	ESI
7239 229	beta cas 104	040306Y2-47	RTVQKVPQKVPQVPQ	2298,13 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1150,8	ESI	[M+3H] ³⁺	767,5	ESI
7239 230	beta cas 105	040306Y1-74	EVQKVPQKVPQVPQ	2298,13 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1170,0	ESI	[M+3H] ³⁺	780,3	ESI
7239 231	beta cas 106	040306Y1-74	EVQKVPQKVPQVPQ	2337,25 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1186,9	ESI	[M+3H] ³⁺	791,7	ESI
7239 232	beta cas 107	040306Y2-48	DEKVPQKVPQVPQ	2370,28 >70%	[HPLC]	[M+H] ⁺	ESI	[M+2H] ²⁺	1164,4	ESI	[M+3H] ³⁺	776,5	ESI
7239 233	beta cas 108	040306Y2-66	LEKVPQKVPQVPQ	2326,23 >70%	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	-	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 234	beta cas 109	040306Y3-18	FDKVPQKVPQVPQ	-	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	-	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 235	beta cas 110	040306Y3-18	FDKVPQKVPQVPQ	-	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	-	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI

7239 236	beta lac 47	040306Y1-55	ALKALPHRLSNTFQLE	2307.2 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1155.3	ESI	[M+3H] ³⁺	770.5	ESI
7239 237 W3	beta lac 48	040306Y1-75	ALPHRLSNTFQLEOCH	2363.12 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1182.8	ESI	[M+3H] ³⁺	788.8	ESI
7239 238 W2	beta lac 49	040306Y1-92	LMHRLSNTFQLEOCHI	2405.16 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1203.9	ESI	[M+3H] ³⁺	802.8	ESI
7239 239	kappa cas 1	040306Y1-32	QEQNQCEKCEKDERFSD	2525.1 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1264.3	ESI	[M+3H] ³⁺	843.3	ESI
7239 240	kappa cas 2	040306Y1-18	NQCEKCEKCEKDERFSDKIA	2452.15 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1227.8	ESI	[M+3H] ³⁺	819.0	ESI
7239 241	kappa cas 3	040306Y1-93	QPIRCEKCEKCEKDERFSDKIA	2485.24 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1244.4	ESI	[M+3H] ³⁺	830	ESI
7239 242	kappa cas 4	040306Y1-93	RCEKCEKCEKCEKDERFSDKIA	2485.24 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1244.4	ESI	[M+3H] ³⁺	829.7	ESI
7239 243	kappa cas 5	040306Y2-49	KDERFSDKIAKPIQYI	2472.3 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1237.9	ESI	[M+3H] ³⁺	825.7	ESI
7239 244	kappa cas 6	040306Y3-96	RFFSDKIAKPIQYI	2506.33 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1254.9	ESI	[M+3H] ³⁺	837	ESI
7239 245 W1	kappa cas 7	230506X28	ISDKIAKPIQYI	2403.23 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1203.2	ESI	[M+3H] ³⁺	802.2	ESI
7239 246	kappa cas 8	040306Y2-87	IAKPIQYI	2357.22 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2501.4	ESI	[M+2H] ²⁺	1180.3	ESI	[M+3H] ³⁺	787.2	ESI
7239 247	kappa cas 9	040306Y2-89	QYIQLSRYPYGLNYQQK	2499.19 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1251.2	ESI	[M+3H] ³⁺	834.3	ESI
7239 248 W1	kappa cas 10	040306Y2-89	QYIQLSRYPYGLNYQQK	2479.2 >80% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1241.1	ESI	[M+3H] ³⁺	827.5	ESI
7239 249 W1	kappa cas 11	040306Y2-50	VL SRYPYGLNYQQK	2358.19 >80% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1180.3	ESI	[M+3H] ³⁺	787.2	ESI
7239 250	kappa cas 12	040306Y2-58	RYPSGLNYQQK	2400.17 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1201.7	ESI	[M+3H] ³⁺	801.2	ESI
7239 251	kappa cas 13	040306Y2-51	SYGLNYQQK	2372.17 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1188.5	ESI	[M+3H] ³⁺	792.5	ESI
7239 252	kappa cas 14	040306Y2-90	QYIQLSRYPYGLNYQQK	2422.22 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1210.3	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 253	kappa cas 15	040306Y1-19	YQKQKVALINQFLPYPA	2429.2 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2431.4	ESI	[M+2H] ²⁺	1219.9	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 254	kappa cas 16	040306Y1-20	KVALINQFLPYPA	2306.2 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1154.6	ESI	[M+3H] ³⁺	769.8	ESI
7239 255	kappa cas 17	040306Y3-26	ALINQFLPYPA	2306.2 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1154.6	ESI	[M+3H] ³⁺	770.7	ESI
7239 256	kappa cas 18	040306Y1-21	NNQFLPYPA	2266.12 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1134.8	ESI	[M+3H] ³⁺	756.9	ESI
7239 257	kappa cas 19	040306Y1-21	NNQFLPYPA	2266.12 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1133.9	ESI	[M+3H] ³⁺	756.3	ESI
7239 258	kappa cas 20	040306Y3-21	YPYPAKPAVRSPAQIL	2345.2 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1175.8	ESI	[M+3H] ³⁺	784.5	ESI
7239 259	kappa cas 21	040306Y3-43	YAKPAVRSPAQILQWQVLS	2225.21 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1113.8	ESI	[M+3H] ³⁺	721.2	ESI
7239 260	kappa cas 22	040306Y3-77	PAVRSPAQILQWQVLS	2177.18 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1089.8	ESI	[M+3H] ³⁺	746.3	ESI
7239 261	kappa cas 23	040306Y2-23	VRSPAQILQWQVLS	2234.23 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2212.1	ESI	[M+2H] ²⁺	1106.3	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 262	kappa cas 24	040306Y3-22	PAQILQWQVLS	2210.13 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1106.9	ESI	[M+3H] ³⁺	736.3	ESI
7239 263 W2	kappa cas 25	300606X-18	ILQWQVLS	2210.13 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1096.7	ESI	[M+3H] ³⁺	731.4	ESI
7239 264	kappa cas 26	040306Y2-57	WQVLS	2189.05 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2193.3	ESI	[M+2H] ²⁺	1071.7	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 265	kappa cas 27	040306Y1-16	LSNTVPKSCQAQPTIMARH	2157.05 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1080.2	ESI	[M+3H] ³⁺	720.5	ESI
7239 266	kappa cas 28	040306Y2-92	TVPAKSCQAQPTIMARH	2197.05 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1099.7	ESI	[M+3H] ³⁺	733.5	ESI
7239 267	kappa cas 29	040306Y3-44	AKSCQAQPTIMARH	2260.04 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1131.7	ESI	[M+3H] ³⁺	754.8	ESI
7239 268	kappa cas 30	040306Y2-93	QPTIMARH	2265.11 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1155.6	ESI	[M+3H] ³⁺	756.5	ESI
7239 269	kappa cas 31	040306Y2-69	TMARH	2309.17 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1189.7	ESI	[M+3H] ³⁺	771.0	ESI
7239 270	kappa cas 32	040306Y2-24	RHPHLSFMAIPKKNQDK	2377.22 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1166.7	ESI	[M+3H] ³⁺	778.3	ESI
7239 271	kappa cas 33	040306Y2-94	HPLSMAIPKKNQDK	2330.18 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1136.8	ESI	[M+3H] ³⁺	758.3	ESI
7239 272	kappa cas 34	040306Y1-94	HPLSMAIPKKNQDK	2270.19 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1126.9	ESI	[M+3H] ³⁺	751.5	ESI
7239 273	kappa cas 35	040306Y1-95	LSFMAIPKKNQDK	2251.18 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1076.8	ESI	[M+3H] ³⁺	718.3	ESI
7239 274 W2	kappa cas 36	040306Y1-96	MAIPKKNQDK	2151.11 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1078.9	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 275	kappa cas 37	040306Y1-68	PPKKNQDK	2156.06 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2157.6	ESI	[M+2H] ²⁺	1037.2	ESI	[M+3H] ³⁺	691.8	ESI
7239 276	kappa cas 38	040306Y3-55	KNQDK	2071 >90% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1030.6	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 277	kappa cas 39	040306Y2-94	DKTEIPTINTASGEPT	2057.97 >90% (HPLC)	[M+H] ⁺	2059.3	ESI	[M+2H] ²⁺	1010.1	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 278	kappa cas 40	040306Y1-56	EPTINTASGEPT	2017.98 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2018.8	ESI	[M+2H] ²⁺	988.4	ESI	[M+3H] ³⁺	660.2	ESI
7239 279 W1	kappa cas 41	230506X-36	TINTASGEPT	1976.93 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	988.4	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 280	kappa cas 42	040306Y3-78	TASGEPT	1976.93 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	1978.8	ESI	[M+2H] ²⁺	1018.5	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 281	kappa cas 43	040306Y2-53	SGETPT	2034.94 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2037.4	ESI	[M+2H] ²⁺	1039.1	ESI	[M+3H] ³⁺	693.1	ESI
7239 282	kappa cas 44	040306Y3-45	PTSTPT	2074.97 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2106.3	ESI	[M+2H] ²⁺	1054.1	ESI	[M+3H] ³⁺	703.0	ESI
7239 283	kappa cas 45	040306Y3-79	PTSTPT	2104.97 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2128.4	ESI	[M+2H] ²⁺	1085.2	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 284	kappa cas 46	040306Y3-46	TEAVEST	2126.98 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2141.7	ESI	[M+2H] ²⁺	1071.2	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 285 W2	kappa cas 47	300606X-41	VEST	2145.05 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1098.9	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 286	kappa cas 48	040306Y3-56	TVAT	2195.05 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	-	ESI	[M+2H] ²⁺	1071.4	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 287	kappa cas 49	040306Y3-80	TLEDSP	2141.01 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2142.9	ESI	[M+2H] ²⁺	1056.3	ESI	[M+3H] ³⁺	-	ESI
7239 288	kappa cas 50	040306Y3-57	DSPEV	2109.06 >70% (HPLC)	[M+H] ⁺	2113.3	ESI	[M+2H] ²⁺	-	-	[M+3H] ³⁺	704.7	ESI
7239 289	kappa cas 51	130406X-01	PEV	-	[M+H] ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-

